Sz

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, A. J. J. Vandevelde-Gent, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Vierundsechzigster Band.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1914.

LEESMUSEUM AMSTERDAM.

QP501
.B58
v.64

CHEMISTRY LIBRARY

CHEMISTRY LIBRARY

JOURNAL
Does Not Circulate

RIJKSMUSEUM
AMSTERDAM
M

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, A. J. J. Vandevelde-Gent, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Vierundsechzigster Band.

INDIANA UNIVERSITY LIBRARY

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1914.

RIJKSMUSEUM AMSTERDAM

351241

QP501
.B58
v.64

INDIANA UNIVERSITY
LIBRARY

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Pincussohn, Ludwig und **Kurt Rüdiger von Roques.** Untersuchungen über die fermentativen Eigenschaften des Blutes. IV. 1

Rona, P. und **Z. Bien.** Zur Kenntnis der Esterase des Blutes. VI. 13

Röhmann, F. Über die Ernährung von Mäusen mit einer aus einfachen Nahrungsstoffen zusammengesetzten Nahrung 30

Hiller, Aladár und **Béla v. Purjesz.** Beiträge zur Ausscheidung des Kaliums bei einer Malariaerkrankung 63

Wagner, Richard. Über Nebennierenkephalin und andere Lipoide der Nebennierenrinde 72

Koessowicz, Alexander. Zur Frage der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Hefen und Schimmelpilze 82

Hekma, E. Über das Fibrin und seine Beziehung zu einigen Problemen der Biologie und Kolloidchemie. IV. 86

Herzfeld, E. Beiträge zur Chemie der proteolytischen Fermente . . 103

Masslow, M. Zur Frage nach den Zerrüttungen des Knochensystems durch phosphorarme Ernährung. III. 106

Doby, G. Über Pflanzenenzyme. I. Die Oxydasen des Maiskolbens 111

Krauß, Friedericke. Weitere Versuche über die Reaktion zwischen Antikörper und gelöstem Antigen 125

von Fürth, Otto. Über die Beziehungen der Milchsäure zum Kohlenhydratstoffwechsel. I. 131

von Fürth, Otto. Über die Beziehungen der Milchsäure zum Kohlenhydratstoffwechsel. II. 156

von Fürth, Otto und **Theodor Hryntschak.** Über den Karnosingehalt der Säugetiermuskeln 172

Sassa, Rempei. Über die quantitative Bestimmung der Oxyproteinsäurefraktion im normalen und pathologischen Harne 195

Krauß, Friedericke. Über die Bindungsverhältnisse zwischen Antikörper und Antigen 222

Thorsch, Margarete. Versuche über die Veränderungen von Blutkörperchen durch Osmium und Alkohol 230

Kostytschew, S. Zur Frage der Bildung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung 237

Neuberg, C. und **J. Kerb.** Über die Rolle des Acetaldehyds bei der Alkoholgärung. Bemerkung zur vorstehenden Mitteilung von S. Kostytschew 251

Seite

Banc, Albert. Untersuchungen über die Wirkung von ultravioletten Strahlen auf die Lävulose. Bildung von Formaldehyd und Kohlenoxyd 257

Rona, Peter und **Koloman von Tóth.** Über die Adsorption des Traubenzuckers. II. 288

Erlenmeyer, Emil. Darstellung von Links- und Rechtszimtsäure durch asymmetrische Induktion 296

Erlenmeyer, Emil. Über die asymmetrische Synthese von l- und d-Isovaleriansäure mit Hilfe der asymmetrischen Induktion . . 366

Erlenmeyer, Emil. Darstellung von linksdrehendem Benzaldehyd durch asymmetrische Induktion mit Hilfe von Rechtsweinsäure, Überführung desselben in linksdrehendes Mandelsäurenitril und rechtsdrehende Mandelsäure, ein Beitrag zur Erkenntnis enzymatischer Reaktionen 382

Heubner, Wolfgang. Über den Rechnungsfaktor bei der Phosphorbestimmung nach Neumann 393

Heubner, Wolfgang. Über Bestimmung anorganischer Phosphorsäure bei Gegenwart von Phosphorsäureestern 401

Heubner, Wolfgang. Einige Beobachtungen über Phytin 409

Heubner, Wolfgang und **Hermann Stadler.** Über eine Titrationsmethode zur Bestimmung des Phytins 422

Gayda, Tullio. Die Aminosäuren des durch Schwefelsäure hydrolysierten Pferdefleisches 438

Böe, Gunnar. Untersuchungen über die Bedeutung der Schilddrüse für den Kohlenhydratstoffwechsel 450

Bechhold, H. und **J. Ziegler.** Vorstudien über Gicht. III. 471

Pellmanti, Osw. Über die Verteilung des Glykogens im Blute während der Resorption der Kohlenhydrate im Darmrohr 490

Kirschbaum, P. Über eine Modifikation des Ultrafiltrationsapparates 495

Druckfehlerberichtigung 499

Autorenverzeichnis 500

Untersuchungen über die fermentativen Eigenschaften des Blutes. IV.

Untersuchung der Formbestandteile des Blutes auf proteolytische Fähigkeiten.

Von

Ludwig Pincussohn und Kurt Rüdiger von Roques.

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. April 1914.)

Die verschiedenen Bestandteile des Blutes unterscheiden sich wesentlich in ihren proteolytischen Fähigkeiten. Dem Serum normaler Tiere und Menschen kommt nach den ausgedehnten Untersuchungen Abderhaldens und seiner Mitarbeiter eine proteolytische Wirkung nicht zu, während die Leukocyten und Blutplättchen Träger solcher Fähigkeiten sind. Daß Leukocyten eine Protease enthalten, wurde zuerst von Leber[1]) nachgewiesen. Intensiv hat diese Frage dann Jochmann[2, 3]) bearbeitet, der im Gegensatz zu früheren Untersuchungen nachwies, daß auch die normalen Leukocyten eine Protease enthalten. Pfeiffer[4]) und Erben[5]) konnten diese Angaben bestätigen. Wichtig für die experimentelle Untersuchung der Leukocytenfermente ist die Angabe von Hertz[6]), daß auch die Leukocyten des sterilen Eiters Protease enthalten, daß also auch der durch Terpentin und ähnliche Mittel gewonnene Eiter ein gutes Material für die Fermentuntersuchungen

---

[1]) Leber, Die Entstehung der Entzündung. Leipzig 1891.
[2]) G. Jochmann, Virchows Arch. **194**, 352.
[3]) G. Jochmann, Zeitschr. f. Hygiene **61**, 71.
[4]) Th. Pfeiffer, Wiener klin. Wochenschr. **1906**, 1249.
[5]) Erben, Münch. med. Wochenschr. **1906**, 2657.
[6]) Hertz, Münch. med. Wochenschr. **1908**, 957.

bildet. Jochmann und Lockemann[1]) konnten dann weiter zeigen, daß das Leukocytenferment Fibrin und Casein verdaut. Für den Nachweis dieses Fermentes eignet sich am besten nach den bisherigen Untersuchungen die von Müller und Jochmann[2]) angegebene Methode, Blutserum auf einer Petrischale erstarren zu lassen und zu beobachten, ob ein darauf getaner Tropfen Eiter eine Verdauung des geronnenen Bluteiweißes hervorbringt. Die peptolytische Fähigkeit von Leukocyten ist von den meisten Autoren bisher abgelehnt worden; nur Jobling[3]) stellte neuerdings in frischen Leukocyten ein schwaches peptolytisches Ferment fest.

Blutplättchen besitzen nach Abderhalden und Manwaring[4]) ein starkes peptolytisches Ferment; über die proteolytischen Fermente dieser Bestandteile ist kaum etwas Exaktes bekannt.

Umgekehrt als bei den Leukocyten scheinen nun die Verhältnisse bei den Erythrocyten zu liegen. Diese enthalten außerordentlich starke Peptasen; Abderhalden und Deetjen[5]) konnten zeigen, daß die isolierten Blutkörperchen vom Pferd, Hund, Hammel, Kaninchen Polypeptide, die durch das Plasma der gleichen Tierart nicht verändert werden, energisch aufspalten, und Abderhalden mit Manwaring (l. c.) hat das gleiche für das Rind nachgewiesen.

Über die proteolytischen Fähigkeiten der roten Blutkörperchen bestehen an sich nur wenig Angaben. Der einzige, der diese fermentative Fähigkeit behauptet, ist Schippers[6]); auch er findet keine starke Proteasewirkung. Nun hängen die proteolytischen Fermente von Organzellen augenscheinlich eng zusammen mit ihrer Fähigkeit, zu autolysieren, und es sind höchstwahrscheinlich dieselben Fermente, die autolytisch gegenüber der eigenen Zelle, heterolytisch gegenüber anderem Eiweiß, sei

[1]) Jochmann und Lockemann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 450.

[2]) Müller und Jochmann, Münch. med. Wochenschr. **1906**, 26.

[3]) Jobling und Strouse, Journ. of exp. med. **16**, 270.

[4]) Abderhalden und Manwaring, Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**, 377.

[5]) Abderhalden und Deetjen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 334; **53**, 280.

[6]) Schippers, diese Zeitschr. **28**, 418.

es der gleichen oder verschiedener Art, wirken. Die Angaben über das autolytische Vermögen der roten Blutkörperchen sind nun auch nicht ganz einheitlich; nach den Versuchen von Schippers (l. c.) findet in der Tat auch Autolyse statt. Dem widersprechen aber Angaben von Oker-Blom[1]), der eine Autolyse der roten Blutkörperchen durchaus abstreitet, und auch Preti[2]) gibt in seiner unter Leitung von Salkowski ausgeführten Untersuchung an, daß die Autolyse anderer Organe zwar auch bei Gegenwart von Blut vor sich geht, daß die Autolyse des Blutes aber selbst eine sehr geringe ist.

Wir haben uns in unseren Versuchen die Frage vorgelegt, ob den roten Blutkörperchen ein eiweißspaltendes Ferment zukommt und haben speziell diese Fähigkeit gegenüber arteigenem Organeiweiß festzustellen gesucht. In der Methodik hielten wir uns im wesentlichen an den für das Dialysierverfahren von Abderhalden ausgearbeiteten Vorschriften. Die Versuche mit roten Blutkörperchen wurden so ausgeführt, daß das aus der Arterie entnommene Blut geschlagen wurde, nach Entfernung des Fibrins wurde zentrifugiert, das Serum und die Leukocytenschicht entfernt, mit Kochsalzlösung zum ursprünglichen Volumen aufgefüllt, wieder zentrifugiert und diese Prozedur mehrere Male wiederholt. Von dem so erhaltenen Blutkörperchenbrei in Kochsalzlösung wurden verschiedene Konzentrationen hergestellt und von diesen je 1,5 ccm in die Dialysierhülsen eingefüllt. Als Außenflüssigkeit dienten 15 ccm Wasser bzw. Kochsalzlösung. Wir machten Versuche sowohl mit hämolysierten Blutkörperchen wie mit Blutkörperchenbrei; in letzterem Falle wurde natürlich als Außenflüssigkeit Kochsalzlösung gewählt. Da das für die gewöhnlichen Versuche als Desinfiziens benutzte Toluol die Blutkörperchen auflöst, mußten wir für diese Versuche von diesem Antisepticum absehen. Um aber ein Verdunsten der Flüssigkeit zu vermeiden und auch eine Infektionsgefahr herabzumindern, bedeckten wir den Inhalt der Dialysierhülse sowie die Oberfläche der Außenflüssigkeit mit einer dünnen Schicht von flüssigem Paraffin. Um eine eventuelle Fehlerquelle zu entdecken, wurden einige Versuche ohne jedes Desinfiziens ausgeführt; diese ergaben

[1]) Oker-Blom, Skand. Arch. f. Physiol. **14**, 48.
[2]) Preti, Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 485.

kein anderes Resultat wie die anderen Bestimmungen. Auch der Eiweißabbau durch Trypsinlösungen wird durch diese Versuchsanordnung nicht beeinflußt. Endlich wurde auch festgestellt, daß die Hülsen durch das Paraffin in ihrer Durchlässigkeit nicht verändert werden.

Neben Versuchen mit Erythrocyten haben wir auch solche mit Leukocyten ausgeführt. Die Leukocyten gewannen wir durch Injektion von 1 bis 2 ccm Terpentinöl unter die Haut; der sich bildende sterile Absceß wurde nach einigen Tagen punktiert, das reichlich vorhandene Exsudat zentrifugiert, die Exsudatflüssigkeit, mit der auch ein Versuch angestellt wurde, abgegossen und die Leukocyten wiederholt mit Kochsalz gewaschen. Endlich wurden noch Versuche mit defibriniertem Vollblut, nichthämolisiert und hämolysiert, ausgeführt.

Als Substrat für die Versuche dienten Organstückchen meist desselben, in einigen Fällen auch anderer Tiere, die nach den Vorschriften Abderhaldens für das Dialysierverfahren hergestellt worden waren; in einigen Versuchen auch Eiereiweiß. Die Prüfung eines etwa erfolgten Abbaues geschah mit der Ninhydrinreaktion, unter Zusatz von 0,2 ccm 1 %iger Ninhydrinlösung zu 10 ccm des Dialysats.

Aus unseren Versuchen, die wir nachstehend tabellarisch belegen, ergibt sich, daß wir einen Abbau von koaguliertem Eiweiß durch Blutkörperchen unter den gewählten Verhältnissen niemals nachweisen konnten, sei es, daß die Blutkörperchen in derselben Konzentration, wie sie im Blut vorhanden sind, angewandt wurden, sei es, daß die Blutkörperchenemulsion mehr oder weniger stark verdünnt worden war. Auch eine Autolyse der Erythrocyten wurde niemals beobachtet; bei den Kontrollen ohne Zusatz eines Organs ergab die Außenflüssigkeit nie eine positive Peptonreaktion. Er versteht sich von selbst, daß unter Autolyse hier der gleiche Prozeß verstanden wird, wie bei der Zellautolyse überhaupt, daß Autolyse also nicht mit einer einfachen Auflösung, einer Hämolyse, identisch ist, wenn nicht dabei Eiweißabbauprodukte gebildet werden.

Auch bei unserer Versuchsanordnung konnten wir die proteolytische Fähigkeit der Leukocyten bestätigen; sie bauten alles ihnen dargebotene Substrat ab. Dagegen war die von

Zellen freie Exsudatflüssigkeit proteolytisch nicht wirksam. Ein starker Zusatz von Leukocyten zu einer Blutkörperchenaufschwemmung ergab starken Abbau.

Um die Methodik zu kontrollieren, arbeiteten wir in einigen Fällen ohne Dialysierhülsen; wir mischten Blutkörperchenbrei und Substrat, fügten die der Außenflüssigkeit entsprechende Menge Kochsalzlösung hinzu, ließen die übliche Zeit im Brutschrank verdauen und zentrifugierten dann die Formelemente ab. In 10 ccm der klaren Flüssigkeit fahndeten wir dann auf Abbauprodukte, doch entsprach das Resultat durchaus dem bei der anderen Versuchsanordnung; wir konnten auch hier nie einen Abbau feststellen.

A. Versuch mit Kaninchenblut.

Versuch 1.

Blutkörperchen auf das 8fache verdünnt:

Allein	—
+ Kaninchenniere	—
+ Kaninchenleber	—
+ Phosphorkaninchenleber . .	—
+ Kaninchenmilz	—
+ Kaninchenblutkuchen . .	—

Zur Darstellung des letztgenannten Substrates wurde spontan gewonnener Blutkuchen in kleine Teile geschnitten, diese koaguliert und so lange ausgekocht, bis das Kochwasser keine Ninhydrinreaktion mehr gab.

Auf das 8fache verdünnte Blutkörperchen hämolysiert:

Allein	—
+ Kaninchenniere	—
+ Kaninchenleber	—
+ Phosphorkaninchenleber . .	—
+ Kaninchenmilz	—
+ Kaninchenblutkuchen . . .	—

Kaninchenserum:

Allein	—
+ Kaninchenniere	—
+ Kaninchenleber	—
+ Phosphorkaninchenleber . .	—
+ Kaninchenblutkuchen . . .	—

Versuch 2.

Kaninchen, dem 3 Tage vorher 0,01 g Phosphor in Olivenöl gelöst mit der Schlundsonde verabreicht worden war.

Blutkörperchenbrei auf das 8fache verdünnt:

Allein	—
+ normale Kaninchenleber	—
+ normale Kaninchenmilz	—
+ normaler Kaninchenblutkuchen .	—
+ Phosphorkaninchenniere	—
+ Phosphorkaninchenleber	—

Auf das 8fache verdünnte Blutkörperchen hämolysiert:

Allein	—
+ normale Kaninchenleber	—
+ normale Kaninchenmilz	—
+ normaler Kaninchenblutkuchen .	—
+ Phosphorkaninchenniere	—
+ Phosphorkaninchenleber	—

Kaninchenserum, etwas hämolytisch:

Allein	—
+ normale Kaninchenleber	—
+ normale Kaninchenmilz	—
+ Phosphorkaninchenniere	—
+ Phosphorkaninchenleber	—

B. Versuche mit Hundeblut.

Versuch 1.

Auf das Doppelte verdünnte rote Blutkörperchen:

Allein	—
+ Hundeleber . .	—

Auf das 4fache verdünnte Blutkörperchen:

Allein	—
+ Hundeleber . .	—

Auf das 8fache verdünnte Blutkörperchen:

Allein	—
+ Hundeleber . .	—

Versuch 2.

Auf das 8fache verdünnte Erythrocytenemulsion:

Allein	—
+ Hundeleber . .	—
+ Hundemuskel .	—
+ Kaninchenleber .	—
+ Affenleber . . .	—

Auf das 8fache verdünnte Blutkörperchen hämolysiert:

Allein	—
+ Hundeleber . .	—
+ Hundemuskel .	—
+ Kaninchenleber .	—
+ Affenleber . . .	—

Versuch 3.

Auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllte Blutkörperchen:

Allein	—
+ Hundemuskel .	—
+ Hundeniere . .	—
+ Hundeleber . .	—

Dieselben hämolysiert:

Allein	—
+ Hundemuskel .	—
+ Hundeniere . .	—
+ Hundeleber . .	—

Aus sterilem Absceß gewonnene Leukocyten, abzentrifugiert und mit der 4fachen Menge Kochsalzlösung verdünnt:

Allein	+
+ Hundemuskel .	+
+ Hundeniere . .	+
+ Hundeleber . .	+

1,0 ccm Blutkörperchenemulsion + 0,5 ccm Leukocytenemulsion wie oben:

Allein	+++
+ Hundemuskel .	++
+ Hundeniere . .	++
+ Hundeleber . .	++

Versuch 4.

Blutkörperchenemulsion, auf das 4fache verdünnt:

Allein . . . . . —
+ Hundeleber . . —
+ Hundemuskel . —

Dieselbe hämolysiert:

Allein . . . . . —
+ Hundeleber . . —
+ Hundemuskel . —

Versuch 5.

1,0 ccm Serum + 0,5 ccm Kochsalzlösung:

Allein . . . . . —
+ Hundeleber . . —
+ Hundemuskel . —
+ Hundeniere . . —

1,0 ccm Serum + 0,5 ccm Blutkörperchenemulsion:

Allein . . . . . —
+ Hundeleber . . —
+ Hundemuskel . —
+ Hundeniere . . —

1,5 ccm Exsudatflüssigkeit, frei von Formelementen:

Allein . . . . . —
+ Hundeleber . . —
+ Hundemuskel . —
+ Hundeniere . . —

1,0 ccm Kochsalzlösung + 0,5 ccm Blutkörperchenemulsion:

Allein . . . . . —
+ Hundeleber . . —
+ Hundemuskel . —
+ Hundeniere . . —

C. Versuche mit Pferdeblut.

Versuch 1.

Auf das 8fache verdünnte Blutkörperchen:

Allein . . . . . —
+ Pferdeleber . . —
+ Pferdemuskel . —
+ Pferdeniere . . —
+ Kaninchenleber . —

Dieselben hämolysiert:

Allein	—
+ Pferdeleber . .	—
+ Pferdemuskel . .	—
+ Pferdeniere . .	—
+ Kaninchenleber .	—

Mit der doppelten Verdünnung die entsprechenden Versuche mit gleichen Resultaten.

Versuch 2.

Auf das 8fache verdünnte rote Blutkörperchen:

Allein	—
+ Pferdeleber . .	—
+ Pferdemuskel .	—
+ Pferdeniere . .	—

Dieselben hämolysiert:

Allein	—
+ Pferdeleber . .	—
+ Pferdemuskel .	—
+ Pferdeniere . .	—

Dieselben Versuche mit den doppelten Verdünnungen ergaben die gleichen Resultate.

Versuch 3.

Auf das 4fache verdünnte rote Blutkörperchen:

Allein	—
+ Pferdeleber . .	—
+ Pferdemuskel .	—
+ Pferdeniere . .	—

(Versuch ohne Dialysierhülse, wie oben angegeben.)

Dieselbe Konzentration, hämolysiert:

Allein	—
+ Pferdeleber . .	—
+ Pferdemuskel .	—
+ Pferdeniere . .	—

Versuch mit der doppelten und 4fachen Verdünnung mit dem gleichen Ergebnis.

Versuch 4.

Auf das 8fache verdünnte rote Blutkörperchen:

Allein . . . . . —
+ Pferdemuskel ohne Desinfiziens . . —
+ Pferdeniere . . . . . —

Dieselben:

Allein . . . . . —
+ Pferdemuskel, Desinfiziens: Thymol . —
+ Pferdeniere . . . . . —

Dieselben:

Allein . . . . . —
+ Pferdemuskel, Desinfiziens: Toluol . —
+ Pferdeniere . . . . . —

D. Versuche mit Menschenblut.

Versuch 1.

Lues.

Auf das 8fache verdünnte rote Blutkörperchen:

Allein . . . . . —
+ Menschenleber . —
+ Affenleber . . . —
+ Menschenstruma . —
+ Affenniere . . . —

Dieselben hämolysiert: in allen Fällen ebenfalls —.

Versuch 2.

Aortenstenose.

Rote Blutkörperchenemulsion auf das 8fache verdünnt:

Allein . . . . . —
+ Menschenleber . —
+ Affenleber . . . —
+ Menscheustruma . —
+ Affenniere . . . —

Dieselben hämolysiert: in allen Fällen ebenfalls —.

Versuch 3.

Polycythämie.

Rote Blutkörperchenemulsion auf das 8fache verdünnt:

Allein	—
+ Menschenleber .	—
+ Affenleber . . .	—
+ Menschenstruma .	—
+ Affenniere . . .	—

Dieselben hämolysiert: in allen Fällen ebenfalls —.

Versuch 4.

Lues.

Serum allein	—
„ + Eiereiweiß	—
Vollblut, defibriniert durch Schlagen, allein . . .	—
„ + Eiereiweiß	—
„ defibriniert, durch destilliertes Wasser hämolysiert	—
Dasselbe + Eiereiweiß	—
Rote Blutkörperchen, Emulsion, auf ursprüngliches Volumen aufgefüllt	—
Dieselben + Eiereiweiß	—
Rote Blutkörperchen, ebenso, hämolysiert	—
„ „ + Eiereiweiß	—

Versuch 5.

Normal.

Serum allein	—
„ + Placenta (Mensch)	—
Vollblut, defibriniert, allein	—
„ + Placenta	—
„ hämolysiert, allein	—
„ + Placenta	—
Rote Blutkörperchen, Emulsion, allein .	—
„ „ + Placenta . . .	—
„ „ hämolysiert, allein	—
„ „ + Placenta . . .	—

Versuch 6.

Normales Blut.

Für diesen Versuch wurde koagulierter Blutkuchen vom Mensch als Substrat genommen. Die Darstellung erfolgte so, daß Blutkuchen in kleine Stücke zerschnitten und diese in üblicher Weise präpariert wurden.

Serum allein	—
„ + Blutkuchen	—
Vollblut, defibriniert, allein	—
„ + Blutkuchen	—
„ defibriniert, hämolysiert, allein	—
„ + Blutkuchen	—
Rote Blutkörperchen, Emulsion, allein .	—
„ „ + Blutkuchen . .	—
„ „ hämolysiert, allein	—
„ „ + Blutkuchen . .	—

Eine Reihe anderer Versuche ergab, wenn nicht bakterielle Zersetzungen vorlagen, stets dasselbe Resultat. Unter den gewählten Verhältnissen haben wir also niemals einen Abbau von Eiweiß durch Erythrocyten feststellen können, während andererseits der bereits bekannte Eiweißabbau durch Leukocyten bestätigt werden konnte.

Zur Kenntnis der Esterase des Blutes. VI.

Vergleichende Untersuchungen über Pankreaslipase und Blutesterase.

Von

P. Rona und Z. Bien.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 27. April 1914.)

Mit 14 Figuren im Text.

In einer vorherigen Abhandlung[1]) sind einige Beobachtungen mitgeteilt worden, die dafür sprechen, daß die Lipase des Pankreas und die des Blutserums nicht identisch sind. Zur weiteren Prüfung des gleichmäßigen oder ungleichmäßigen Verhaltens beider Fermente sind die folgenden Untersuchungen angestellt worden; dabei wurden die Wirkungsbedingungen des lipolytischen Ferments aus dem Pankreas nach verschiedener Richtung studiert.

Die zu den Untersuchungen benutzte Pankreaslipase wurde aus Rinderpankreas durch Extraktion mit der etwa 10fachen Gewichtsmenge von 2 Teilen Glycerin und 1 Teil destilliertem Wasser gewonnen. Von diesem Extrakt wurden vor jedem Versuch etwa 10 ccm zentrifugiert, aus der mittleren, nur wenig opalescenten Schicht mittels Capillare 1 bis 2 ccm entnommen. Benutzt wurden davon 3 Tropfen, mit 25 ccm destilliertem Wasser verdünnt. Die Angabe in den Tabellen „1 ccm Ferment" bezieht sich auf diese verdünnte Lösung; sie wurde stets vor dem Gebrauch energisch geschüttelt, um einer eventuellen Ent-

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **59**, 100, 1913.

mischung und der dadurch bedingten ungleichen Fermentverteilung in der Lösung vorzubeugen.

In Übereinstimmung mit Rosenheim[1]) konnten wir auch finden, daß der bei der Verdünnung des Extraktes entstehende Niederschlag den größten Teil des Ferments mit sich reißt Wird dieser Niederschlag wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen und zentrifugiert, so erhält man in dem Niederschlag stets ein voll wirksames Ferment, während die Flüssigkeit fermentativ so gut wie unwirksam ist. Das spricht dafür, daß das Ferment nur als Suspension in der festen Phase wirksam ist, nicht aber in der homogenen wässerigen Phase. Für ein in Wasser gelöstes Koenzym fanden sich keine Anhaltspunkte.

Als Substrat diente, wie in allen früheren Versuchen, eine gesättigte wässerige Lösung von Tributyrin, dessen Spaltung mittels der „Tropfmethode", und zwar bei Zimmertemperatur (ca. 18°) verfolgt wurde. Die Reaktion des Gemisches wurde durch in den Tabellen näher angegebene Regulatoren festgelegt. Die Messung der H-Ionenkonzentration erfolgte stets auf elektrochemischem Wege. Zu jedem Versuch wurden 30 ccm der gesättigten wässerigen Tributyrinlösung, 3 ccm des Regulatorgemisches (Phosphatgemisch $^{m}/_{8}$, Essigsäure $^{n}/_{1}$, Natriumacetat $^{n}/_{1}$) und 1 ccm des „Ferments" verwendet.

Der Verlauf der einzelnen Versuche ist in der folgenden Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Versuch	Regulatorgemisch	p_H elektrometrisch gemessen	[H'] elektrometrisch gemessen	Tropfenzahl nach Minuten 0	12	24	48	Vorhandenes Tributyrin in % nach Minuten 0	12	24	48
I. 1.	10 sek. Phosph. : 3 $^{n}/_{10}$-NaOH	9,30	$5{,}02 \cdot 10^{-10}$	146	137	130	122	100	82	64	46
2.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^{n}/_{10}$-NaOH	8,33	$4{,}68 \cdot 10^{-9}$	146	137	130	119	100	82	64	45
3.	10 sek. Phosph. : 1,2 prim. Phosph.	7,33	$4{,}68 \cdot 10^{-8}$	146	141	135	124	100	89	75	50
	Kontrollversuche ohne Pankreasextrakt.										
1.	10 sek. Phosph. : 3 $^{n}/_{10}$-NaOH	9,30	$5{,}02 \cdot 10^{-10}$	146	145	143	140	100	98	93	87
2.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^{n}/_{10}$-NaOH	8,56	$2{,}76 \cdot 10^{-9}$	146	145	145	142	100	98	98	91

[1]) Journ. of Physiol. 40; Proc. Physiol. Soc. 19. Febr. 1910, S. XIV.

Tabelle I (Fortsetzung).

Versuch	Regulatorgemisch	p_H elektrometrisch gemessen	[H'] elektrometrisch gemessen	Tropfenzahl nach Minuten 0	12	24	48	Vorhandenes Tributyrin in % nach Minuten 0	12	24	48
II. 1.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,29	$5{,}13 \cdot 10^{-9}$	144	133	123	113	100	75	51	31
2.	10 sek. Phosph. : 2 $^n/_{10}$-NaOH	8,47	$3{,}39 \cdot 10^{-9}$	144	133	124	114	100	75	53	33
3.	10 sek. Phosph. : 2,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,56	$2{,}75 \cdot 10^{-9}$	144	134	125	115	100	77	55	35
4.	10 sek. Phosph. : 0,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,04	$9{,}13 \cdot 10^{-9}$	144	135	127	—	100	79	61	—
5.	10 sek. Phosph. : 1 $^n/_{10}$-NaOH	8,11	$7{,}77 \cdot 10^{-9}$	144	135	127	—	100	79	61	—
6.	10 sek. Phosph. : 0,3 $^n/_{10}$-NaOH	8,00	$1{,}00 \cdot 10^{-8}$	144	136	128	117	100	81	63	40
7.	Sek. Phosph.	7,95	$1{,}10 \cdot 10^{-8}$	144	136	129	—	100	81	65	—
	Kontrollversuche ohne Pankreasextrakt.										
1.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,42	$3{,}81 \cdot 10^{-9}$	144	144	144	143	100	100	100	97
2.	10 sek. Phosph. : 2 $^n/_{10}$-NaOH	8,46	$3{,}46 \cdot 10^{-9}$	144	144	144	143	100	100	100	97
3.	10 sek. Phosph. : 2,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,58	$2{,}62 \cdot 10^{-9}$	144	143	143	142	100	97	97	96
4.	10 sek. Phosph. : 3 $^n/_{10}$-NaOH	8,85	$1{,}42 \cdot 10^{-9}$	144	143	142	140	100	97	96	91
5.	10 sek. Phosph. : 1 $^n/_{10}$-NaOH	—	—	144	144	144	144	100	100	100	100
6.	10 sek. Phosph. : 0,5 $^n/_{10}$-NaOH	—	—	144	144	144	144	100	100	100	100
7.	Sek. Phosph.	—	—	144	144	144	144	100	100	100	100
III. 1.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,29	$5{,}13 \cdot 10^{-9}$	146	138	129	116	100	82	61	33
2.	10 sek. Phosph.	7,97	$1{,}10 \cdot 10^{-8}$	146	138	131	118	100	82	67	38
3.	7 sek. Phosph. : 1 prim. Phosph.	7,44	$3{,}65 \cdot 10^{-8}$	146	139	133	122	100	85	70	47
4.	7,5 sek. Phosph. : 3 prim. Phosph.	7,10	$7{,}95 \cdot 10^{-8}$	146	140	135	125	100	87	75	53
5.	6 sek. Phosph. : 3 prim. Phosph.	6,95	$1{,}13 \cdot 10^{-7}$	146	141	136	128	100	90	78	60
6.	1 sek. Phosph. : 1 prim. Phosph.	5,79	$1{,}63 \cdot 10^{-6}$	146	143	140	137	100	93	87	80
	Kontrollversuch mit aufgekochtem Pankreasextrakt.										
1.	10 prim. Phosph. : 0,1 sek. Phosph.	5,23	$5{,}89 \cdot 10^{-6}$	146	146	146	146	100	100	100	100
	Kontrollversuch ohne Pankreasextrakt.										
2.	10 prim. Phosph. : 1,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,28	$5{,}25 \cdot 10^{-9}$	146	146	145	144	100	100	100	98
IV. 1.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,13	$7{,}42 \cdot 10^{-9}$	147	134	123	113	100	68	45	25
2.	9 sek. Phosph. : 1 prim. Phosph.	7,47	$3{,}39 \cdot 10^{-8}$	147	139	132	120	100	81	63	38
3.	6 sek. Phosph. : 3 prim. Phosph.	7,04	$9{,}13 \cdot 10^{-8}$	147	139	132	121	100	81	63	40
4.	1 sek. Phosph. : 7 prim. Phosph.	6,05	$8{,}92 \cdot 10^{-7}$	147	142	138	129	100	88	78	58
5.	1 sek. Phosph. : 12 prim. Phosph.	5,80	$1{,}59 \cdot 10^{-6}$	147	142	139	132	100	88	80	63
6.	0,1 sek. Phosph. : 10 prim. Phosph.	4,87	$1{,}35 \cdot 10^{-5}$	147	143	140	133	100	90	83	66
V. 1.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^n/_{10}$-NaOH	7,87	$1{,}35 \cdot 10^{-8}$	146	130	117	—	100	63	35	—
2.	6 sek. Phosph. : 3 prim. Phosph.	6,97	$1{,}08 \cdot 10^{-7}$	146	136	126	—	100	78	55	—
3.	1 sek. Phosph. : 7 prim. Phosph.	5,95	$1{,}13 \cdot 10^{-6}$	146	139	132	124	100	86	68	50
4.	1 sek. Phosph. : 10 prim. Phosph.	5,77	$1{,}70 \cdot 10^{-6}$	146	139	132	124	100	86	68	50
5.	— prim. Phosph.	4,57	$2{,}70 \cdot 10^{-5}$	146	143	140	134	100	96	87	73
	Kontrollversuche ohne Pankreasextrakt.										
1.	10 sek. Phosph. : 1,5 $^n/_{10}$-NaOH	8,04	$9{,}13 \cdot 10^{-9}$	146	146	146	147	100	100	100	100
2.	— prim. Phosph.	4,71	$1{,}95 \cdot 10^{-5}$	146	146	146	147	100	100	100	100

Tabelle I (Fortsetzung).

Versuch	Regulatorgemisch	p_H elektrometrisch gemessen	[H·] elektrometrisch gemessen	Tropfenzahl nach Minuten 0	12	24	48	Vorhandenes Tributyrin in % nach Minuten 0	12	24	48
VI. 1.	10 sek. Phosph.: 1,5 n/10-NaOH	7,77	$1{,}70 \cdot 10^{-8}$	146	133	121	113	100	68	44	28
2.	6 sek. Phosph.: 3 prim. Phosph.	6,98	$1{,}05 \cdot 10^{-7}$	146	137	129	—	100	80	61	—
3.	4 sek. Phosph.: 11 prim. Phosph.	6,42	$3{,}81 \cdot 10^{-7}$	146	140	133	122	100	87	70	46
4.	32 Na-Acetat: 1 Essigsäure	5,60	$2{,}52 \cdot 10^{-6}$	146	142	139	130	100	91	84	64
5.	1 Na-Acetat: 1 Essigsäure	4,63	$2{,}35 \cdot 10^{-5}$	146	143	140	134	100	95	87	73
6.	1 Na-Acetat: 2 Essigsäure	3,96	$1{,}10 \cdot 10^{-4}$	146	144	142	137	100	97	91	80
	Kontrollversuche ohne Pankreasextrakt.										
1.	10 sek. Phosph.: 1,5 n/10-NaOH	8,22	$6{,}03 \cdot 10^{-9}$	146	146	146	146	100	100	100	100
2.	1 Na-Acetat: 8 Essigsäure	3,98	$1{,}05 \cdot 10^{-4}$	146	146	146	146	100	100	100	100
VII. 1.	10 sek. Phosph.: 1,6 n/10-NaOH	8,55	$2{,}82 \cdot 10^{-9}$	146	119	111	—	100	40	25	—
2.	10 sek. Phosph.: 0,1 n/10-NaOH	7,86	$1{,}39 \cdot 10^{-8}$	146	128	115	111	100	60	32	25
3.	7 sek. Phosph.: 1 prim. Phosph.	7,44	$3{,}64 \cdot 10^{-8}$	146	132	120	113	100	68	41	28
4.	6 sek. Phosph.: 3 prim. Phosph.	7,05	$8{,}92 \cdot 10^{-8}$	146	136	125	114	100	78	53	30
5.	3 sek. Phosph.: 3 prim. Phosph.	6,78	$1{,}66 \cdot 10^{-7}$	146	138	128	—	100	83	60	—
6.	1 Essigsäure: 32 Na-Acetat	5,86	$1{,}39 \cdot 10^{-6}$	146	142	137	127	100	91	80	57
7.	1 Essigsäure: 10 Na-Acetat	5,75	$1{,}78 \cdot 10^{-6}$	146	144	138	129	100	96	82	61
8.	5 Essigsäure: 1 Na-Acetat	3,92	$1{,}21 \cdot 10^{-4}$	146	143	140	134	100	93	86	73
VIII. 1.	10 sek. Phosph.: 0,1 prim. Phosph.	7,83	$1{,}42 \cdot 10^{-8}$	146	127	114	110	100	57	30	23
2.	7 sek. Phosph.: 1 prim. Phosph.	7,41	$3{,}90 \cdot 10^{-8}$	146	131	118	111	100	65	38	25
3.	6 sek. Phosph.: 3 prim. Phosph.	7,08	$8{,}32 \cdot 10^{-8}$	146	134	123	112	100	73	48	27
4.	3 sek. Phosph.: 3 prim. Phosph.	6,75	$1{,}78 \cdot 10^{-7}$	146	135	125	113	100	75	53	28
5.	1 Essigsäure: 32 Na-Acetat	5,65	$2{,}24 \cdot 10^{-6}$	146	140	133	123	100	87	70	48
6.	1 Essigsäure: 10 Na-Acetat	5,48	$3{,}32 \cdot 10^{-6}$	146	140	134	124	100	87	73	50
7.	5 Essigsäure: 1 Na-Acetat	4,14	$7{,}25 \cdot 10^{-5}$	146	142	138	132	100	91	83	70
	Kontrollversuch ohne Pankreasextrakt.										
	10 sek. Phosph.: 1,5 n/10-NaOH	8,31	$4{,}90 \cdot 10^{-9}$	146	146	146	144	100	100	100	97
IX. 1.	10 sek. Phosph.: 1,5 n/10-NaOH	8,58	$2{,}64 \cdot 10^{-9}$	146	122	113	—	100	47	28	—
2.	10 sek. Phosph.: 0,1 prim. Phosph.	7,92	$1{,}21 \cdot 10^{-8}$	146	131	120	—	100	65	41	—
3.	8 sek. Phosph.: 1 prim. Phosph.	7,54	$2{,}89 \cdot 10^{-8}$	146	133	122	—	100	70	47	—
4.	4 sek. Phosph.: 1 prim. Phosph.	7,34	$4{,}47 \cdot 10^{-8}$	146	134	124	—	100	73	50	—
5.	1 sek. Phosph.: 5 prim. Phosph.	6,16	$6{,}92 \cdot 10^{-7}$	146	139	133	124	100	85	70	50
6.	0,5 Essigsäure: 32 Na-Acetat	5,83	$1{,}48 \cdot 10^{-6}$	146	139	134	126	100	85	73	55
7.	1 Essigsäure: 10 Na-Acetat	5,44	$3{,}64 \cdot 10^{-6}$	146	141	135	129	100	89	75	61
8.	15 Essigsäure: 1 Na-Acetat	3,65	$2{,}24 \cdot 10^{-4}$	146	143	140	136	100	95	87	78
	Kontrollversuch ohne Pankreasextrakt.										
	10 sek. Phosph.: 1,5 n/10-NaOH	8,69	$2{,}05 \cdot 10^{-9}$	146	145	144	143	100	—	—	—

Einige der in der Tabelle I angeführten Versuche sind auch graphisch dargestellt (vgl. Fig. 1 bis 4). Die Abszisse

stellt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Tropfenzahl dar. — Die Figuren 1 und 2 illustrieren die für die Spaltung des Tributyrins günstigste H-Ionenkonzentration. Die den Kurven beigegebenen Zahlen sind die H-Ionenkonzentrationen (elektrometrisch gemessen; ausgedrückt in p_H), bei denen die Spaltung abgelaufen ist. Die mit *c* bezeichneten Kurven entsprechen

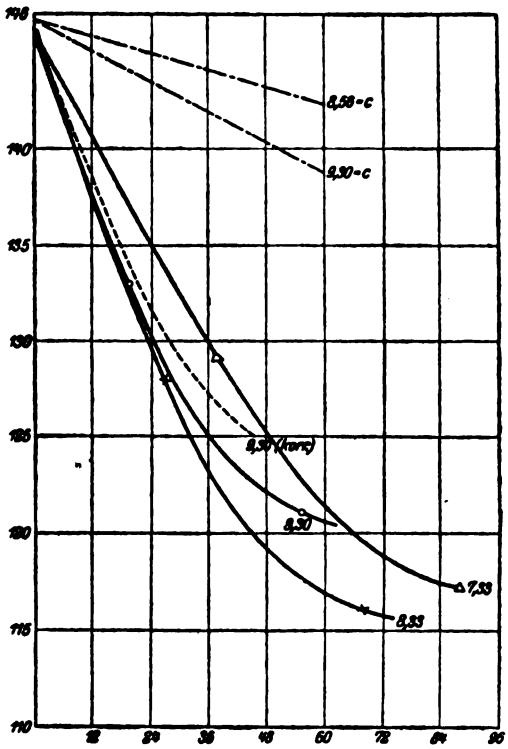


Fig. 1.

den Kontrollversuchen, die die Aufgabe hatten, die Wirkung höherer OH-Ionenkonzentrationen auf die Spaltung des Tributyrins festzustellen. In Übereinstimmung mit früheren Befunden ist eine nachweisbare „Alkalispaltung" innerhalb der Beobachtungszeit der Versuche (1 bis $1^1/_2$ Stunden) erst von $p_H = 8{,}4$ an vorhanden, sie beträgt jedoch selbst bei $p_H = 9{,}3$ in 1 Stunde auch nur etwa 5 Tropfen Abnahme.

Wie die Figuren zeigen, ist eine optimale Wirkung von $p_H = 8{,}4$ zu beobachten, bei 8,0 bis 8,2 ist die Wirkung be-

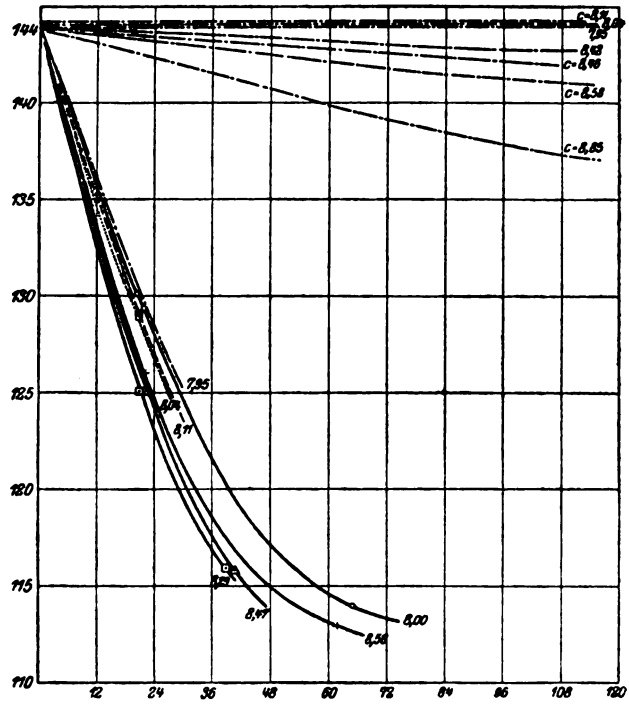


Fig. 2.

reits ein wenig schwächer; andererseits ist sie bei 9,3 (die gestrichene Linie in Fig. 1 zeigt den Verlauf der Spaltung bei $p_H = 9{,}3$ unter Berücksichtigung der gleichzeitigen „Alkalispaltung" bei $p_H = 9{,}3$) nur unwesentlich schwächer als bei $p_H = 8{,}33$. Wir können demnach für die optimale Wirksamkeit des Fermentes die ziemlich breite Zone von $p_H = 8{,}4$ bis etwa 9,0 annehmen[1]). Die im optimalen Gebiete liegen

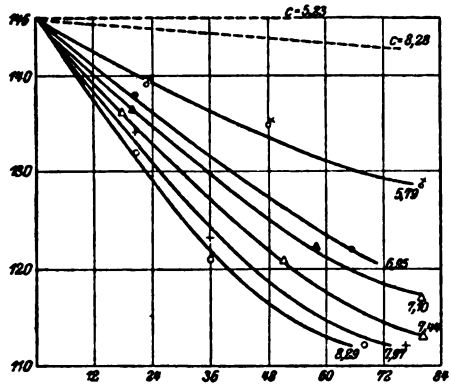


Fig. 3.

[1]) Vgl. hierzu E. F. Terroine, diese Zeitschr. 28, 404, 1910.

den Punkte des Verlaufs der fermentativen Spaltung ersieht man gut aus der Fig. 2. Die Fig. 3 und 4 zeigen das Ausmaß der Spaltungen auch in den sauren Gebieten (bis $p_H = 3{,}65$).

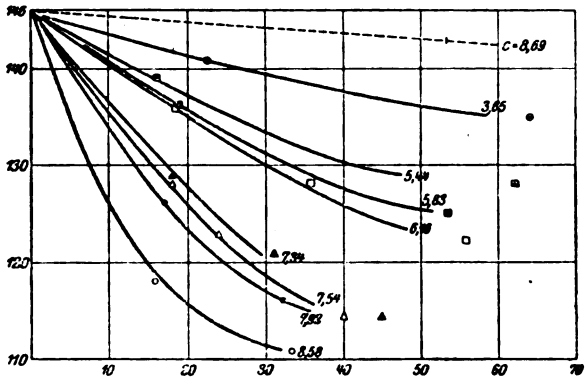


Fig. 4.

In dem wirksamen Gebiete ist die Pankreaslipase als Anion vorhanden. Dies zeigen die folgenden Überführungsversuche (Tabelle II). Bei diesen wurden 0,15 ccm des Glycerinextraktes aus Rinderpankreas mit 20 ccm des Regulatorgemisches ver-

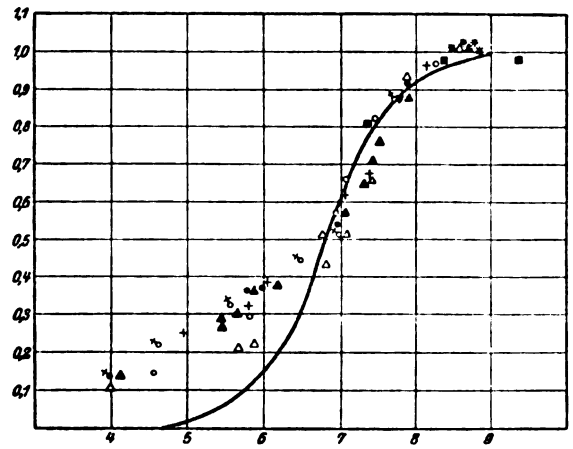


Fig. 5.

setzt. Diese Flüssigkeit diente als Mittelflüssigkeit; als Seitenflüssigkeit dasselbe Regulatorgemisch ohne das Ferment. Die Dauer des Stromdurchganges betrug 50 bis 90 Minuten.

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Zusammensetzung des Regulatorgemisches	[H] elektrometrisch gemessen	p_H elektrometrisch gemessen	Wanderung
1	Phosphatgemisch zu $^1/_{30}$ mol. prim. 1, sek. 7	$0{,}36 \cdot 10^{-7}$	7,44	anodisch
2	Phosphatgemisch zu $^1/_{30}$ mol. prim. 4, sek. 1	$0{,}56 \cdot 10^{-6}$	6,25	anodisch
3	Phosphatgemisch zu $^1/_{30}$ mol. prim. 6, sek. 1	$0{,}73 \cdot 10^{-6}$	6,13	anodisch
4	Phosphatgemisch zu $^1/_{30}$ mol. prim. 10, sek. 1	$1{,}14 \cdot 10^{-6}$	5,94	anodisch
5	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 1, Natriumacetat 10	$1{,}79 \cdot 10^{-6}$	5,74	anodisch
6	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 1, Natriumacetat 1	$0{,}22 \cdot 10^{-4}$	4,65	anodisch
7	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 2, Natriumacetat 1	$0{,}39 \cdot 10^{-4}$	4,40	steht still
8	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 3, Natriumacetat 1	$0{,}57 \cdot 10^{-4}$	4,24	steht still (sehr schwach kathodisch)
9	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 3, Natriumacetat 1	$0{,}62 \cdot 10^{-4}$	4,21	kathodisch
10	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 3, Natriumacetat 1	$0{,}62 \cdot 10^{-4}$	4,21	kathodisch
11	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 3, Natriumacetat 1	$0{,}62 \cdot 10^{-4}$	4,21	kathodisch
12	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 5, Natriumacetat 1	$0{,}91 \cdot 10^{-4}$	4,03	kathodisch
13	Acetatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Essigsäure 5, Natriumacetat 1	$1{,}00 \cdot 10^{-4}$	3,99	kathodisch
14	Lactatgemisch zu $^1/_{10}$ n, Milchsäure 1, Natriumlactat 10	$0{,}39 \cdot 10^{-3}$	2,40	kathodisch

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wandert das Ferment von $p_H = 4{,}65$ an nach der alkalischen Richtung rein anodisch, von etwa 4,2 nach der sauren Richtung rein kathodisch; dazwischen befindet sich ein äußerst schwaches Gebiet des Stillstandes. Jedenfalls folgt nach den obigen Untersuchungen über den Einfluß der H·-Ionenkonzentrationen auf die Wirksamkeit des Fermentes und nach den eben erwähnten Überführungsversuchen, daß die Fermentanionen die wirksamen sind. Im Gebiete der kathodischen Wanderung ist das Ferment unwirksam.

Berechnet man die relativen Umsatzgeschwindigkeiten bei den verschiedenen H·-Ionenkonzentrationen und trägt die Werte als Funktion von p_H in einem Koordinatensystem als Ordinate ein, so erhält man die in der Fig. 5 eingezeichneten Punkte;

die verschiedenen Zeichen entsprechen den verschiedenen Versuchen. Zeichnet man nun in den entsprechenden Maßen[1]) die theoretische Dissoziationskurve einer Säure mit der Dissoziationskonstante $1{,}7 \cdot 10^{-7}$ ($p_H = 6{,}8$), so finden wir eine ausgezeichnete Übereinstimmung der experimentell ermittelten Punkte mit denen der theoretischen Kurve in dem alkalischen und im neutralen Gebiete (bis etwa $p_H = 6{,}5$). Im sauren Gebiete sind die Abweichungen jedoch ziemlich groß; die Spaltungen sind hier durchwegs intensiver, als dies nach der theoretischen Kurve zu erwarten wäre. Obgleich in diesem Gebiete die quantitative Feststellung der relativen Umsatzgeschwindigkeit infolge der geringen Umsätze mit größeren Fehlern behaftet ist, so kann die Unstimmigkeit trotzdem nicht etwa auf diese experimentellen Fehler bezogen werden, da die Werte durch sehr viele Einzelversuche sichergestellt sind. Auch eine „Säurespaltung" in dem fraglichen Gebiete ist durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen. Einen sicheren Grund für diese Abweichung von der Theorie können wir vorläufig nicht angeben. Möglich, daß nicht nur die Anionen, sondern auch die undissoziierten Fermentmoleküle an der Spaltung teilnehmen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß die theoretischen Deduktionen bei Zurückführung der Fermentwirksamkeiten auf die Dissoziation einer Säure bzw. eines amphoteren Elektrolyten bei Substratkonzentrationen, die gegen die molare Konzentration des Fermentes nicht sehr groß sind — wie das hier der Fall ist — eine Modifikation erfahren müssen. Weitere Untersuchungen hierüber werden wohl Aufklärung verschaffen.

Jedenfalls können wir auf Grund des gesamten experimentellen Materials sagen, daß das Optimum der Wirksamkeit der Lipase aus Pankreas bei $p_H = 8{,}3$ bis etwa 9,0 liegt, also in einem deutlich alkalischeren Gebiete, wie das Optimum der Blutlipase. Bei $p_H = 6{,}8$ ist die Wirksamkeit etwa halb so groß, wie die bei der optimalen Reaktion gefundene. Wirksam sind die Anionen, und die in der Fig. 5 gezeichnete Kurve würde (mit den obigen Einschränkungen) den Dissoziationsgrad in bezug auf die Anionen darstellen. Die Säuredissoziations-

[1]) Die angewandte Maßeinheit stimmt mit der „rationalen" überein.

konstante wäre demnach $1{,}8 \cdot 10^{-7}$; diese zeigt demnach einen von dem der Blutlipase ($1 \cdot 10^{-6}$) abweichenden Wert[1]).

In einer neueren Arbeit hat L. Michaelis[2]) darauf hingewiesen, daß man die wahre elektrolytische Dissoziationskonstante des Fermentes (k) nach der Gleichung $k = q\,(1 + a\,S)$ findet, wo a die Affinitätskonstante des spaltbaren Substrats zu den wirksamen Fermentmolekülen, S die Konzentration des spaltbaren Substrats, q der Parameter der Dissoziationskurve ist. In unserem Falle ist jedoch die Substratkonzentration S infolge der nur spurweisen Löslichkeit des Tributyrins nur äußerst gering (weniger als ein Hunderttausendstel molar). Da die Größenordnung der Affinitätskonstante nur etwa 100 ist, ist das Produkt $a\,S$ klein gegen Eins, so daß wir praktisch k und q gleich setzen können. Auf die theoretische Schwierigkeit der Anwendung einer auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden Formel auf ein System, in dem das Ferment wahrscheinlich nicht gelöst, sondern suspendiert ist, wollen wir zunächst in dieser rein experimentellen Arbeit nicht eingehen. Auf alle Fälle ist die als „Dissoziationskonstante" bezeichnete Größe als eine für das Ferment gut reproduzierbare, charakteristische Konstante zu betrachten.

Finden wir demnach in der erwähnten Konstanten deutliche Differenzen zwischen der Pankreas- und der Darmlipase, so verhalten sich diese Fermente auch verschieden bei der Spaltung der verschiedenen Ester. In einer früheren Abhandlung konnten wir zeigen, daß die gesättigten wässerigen Lösungen verschiedener Triglyceride von der Esterase des Blutserums von Kaninchen in verschiedenem Umfange gespalten werden. Die

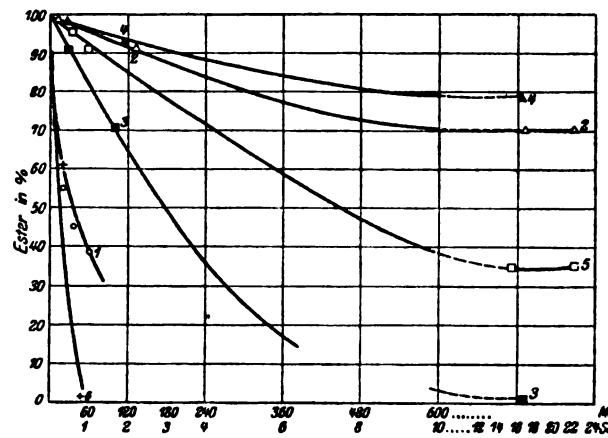


Fig. 6.

[1]) Vgl. hierzu Davidsohn, diese Zeitschr. 45, 284, 1912.
[2]) Diese Zeitschr. 60, 91, 1913.

Spaltbarkeit dieser Ester erfolgt in folgender Reihenfolge, nach abnehmender Spaltbarkeit geordnet: Tributyrin, Tricaproin, Triisobutyrin, Triisovalerin, Trivalerin, Tripropionin. — Bei der Pankreaslipase konnte unter denselben Versuchsbedingungen ebenfalls eine verschiedene Spaltbarkeit derselben Ester nachgewiesen werden; die Reihenfolge der Ester nach abnehmender Spaltbarkeit geordnet ist aber etwas verschieden von der vorherigen: Tricaproin, Tributyrin, Trivalerin, Tripropionin, Triisobutyrin, Triisovalerin.

Tabelle III.

	Ester	p_H elektrometrisch gemessen	[H] elektrometrisch gemessen	Vorhandene Menge Ester in % nach Stunden				
				0	1	2	5	10
1	Tributyrin	7,40	$3{,}99 \cdot 10^{-8}$	100	38	—	—	—
2	Triisobutyrin . . .	7,43	$3{,}72 \cdot 10^{-8}$	100	95	90	80	70
3	Trivalerin	7,26	$5{,}50 \cdot 10^{-8}$	100	80	65	25	10
4	Triisovalerin	7,43	$3{,}72 \cdot 10^{-8}$	100	96	93	86	80
5	Tripropionin	6,95	$1{,}13 \cdot 10^{-7}$	100	92	85	65	38
6	Tricaproin	7,26	$5{,}50 \cdot 10^{-8}$	100	10	—	—	—
	Kontrollversuche ohne Pankreasextrakt:							
1	Tributyrin	7,47	$3{,}39 \cdot 10^{-8}$	100	100	100	100	100
2	Triisobutyrin . . .	7,45	$3{,}55 \cdot 10^{-8}$	100	100	100	100	100
3	Trivalerin	7,52	$3{,}02 \cdot 10^{-8}$	100	100	100	100	100
4	Triisovalerin	7,48	$3{,}32 \cdot 10^{-8}$	100	100	100	100	100
5	Tripropionin	7,36	$4{,}37 \cdot 10^{-8}$	100	100	100	100	100
6	Tricaproin	7,31	$5{,}00 \cdot 10^{-8}$	100	100	100	100	100

Wie die elektrometrisch festgestellte H-Ionenkonzentration zeigt, erfolgte die Spaltung in allen Fällen bei fast gleicher, für die Spaltung günstiger H-Ionenkonzentration. Nur beim Tripropionin war die Lösung ein wenig saurer, also etwas ungünstiger als bei den anderen Estern; bei der alkalischeren Reaktion wäre die Spaltung wohl noch intensiver. Die Stellung dieses Esters in der Spaltungsreihe bei der Pankreaslipase ist somit ganz anders wie in der bei der Blutlipase.

Prinzipielle Unterschiede konnten ferner in dem Verhalten beider Lipasen bei der Einwirkung verschiedener Salze auf diese Fermente beobachtet werden. Über die fördernde Wirkung der Calciumsalze auf die Pankreaslipase sind wir durch die Untersuchungen von Kanitz[1]), Pottevin[2]) und in neuerer Zeit namentlich von Pekelharing[3]) unterrichtet. Wir

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 482, 1905.
[2]) Bull. Soc. Chim. [3] 35, 693, 1906; Compt. rend. 136, 767.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 355, 1912.

können die diesbezüglichen Angaben im wesentlichen bestätigen. Die mächtige Förderung der esterspaltenden Wirkung durch $CaCl_2$ ist sehr deutlich aus der Fig. 7 ersichtlich. (In den Figuren 7 bis 14 ist die Zeit in Minuten als Abszisse, die Tropfenzahl als Ordinate aufgetragen.) Bei diesen, wie auch in den folgenden Versuchen ist als Regulator die Sörensensche „Glykokollmischung"

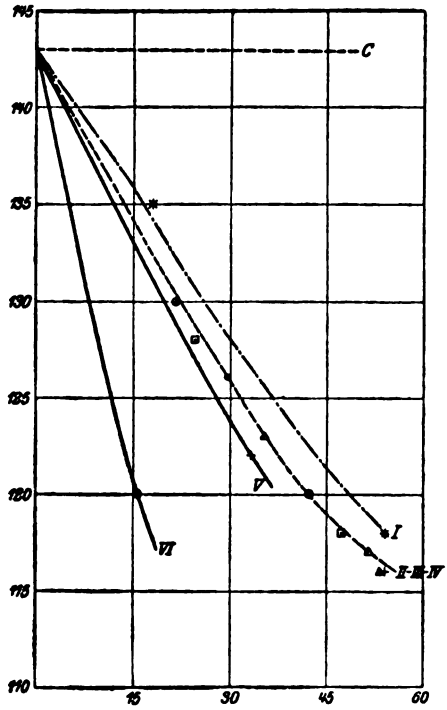


Fig. 7. Nicht dialysierter Pankreasextrakt.
I ohne $CaCl_2$-Zusatz. *II*—*IV* Zusatz von $^1/_{4800}$, $^1/_{1200}$, $^1/_{600}$ mol. $CaCl_2$. *V* Zusatz von $^1/_{300}$ mol. $CaCl_2$. *VI* Zusatz von $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$. *C* Kontrollversuch mit $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$ ohne Ferment.

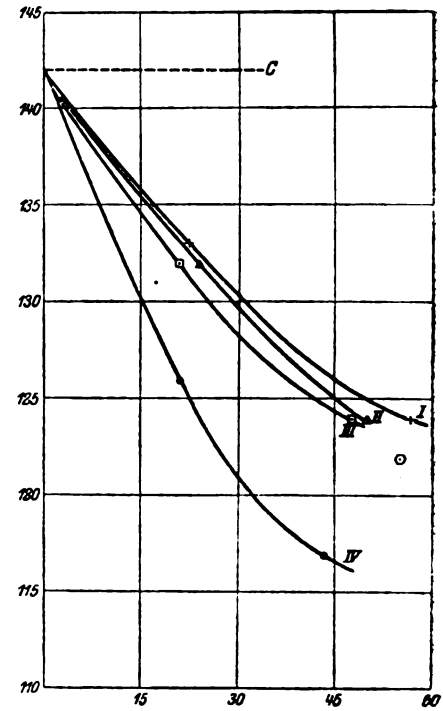


Fig. 8. Versuch mit dialysiertem Pankreasextrakt.
I Verlauf der Spaltung ohne $CaCl_2$-Zusatz. *II* Zusatz von $^1/_{1200}$ mol. $CaCl_2$. *III* von $^1/_{300}$ mol. $CaCl_2$. *IV* von $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$. *C* Kontrolle mit $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$ ohne Ferment.

benutzt worden; die Prüfung der geeigneten H-Ionenkonzentration erfolgte entweder elektrometrisch oder colorimetrisch mittels Neutralrot. In einer Vergleichsreihe wurden natürlich alle Bedingungen (Tributyrin-, Ferment-, H-Ionenkonzentration, Gesamtvolumen) gleichgehalten, nur die Salzkonzentration variiert. Die mit I bezeichnete Linie in der Fig. 7 stellt den Spaltungsverlauf ohne Zu-

satz von $CaCl_2$ dar. Bereits Zusatz zu etwa $^1/_{4800}$ molar zeigt eine geringe Begünstigung der Spaltung, die jedoch durch Erhöhung der $CaCl_2$-Konzentration bis $^1/_{600}$ molar nicht nachweislich erhöht wird: die experimentell ermittelten Punkte im Verlaufe der fermentativen Spaltung bei Zusatz von $CaCl_2$ zu $^1/_{4800}$,

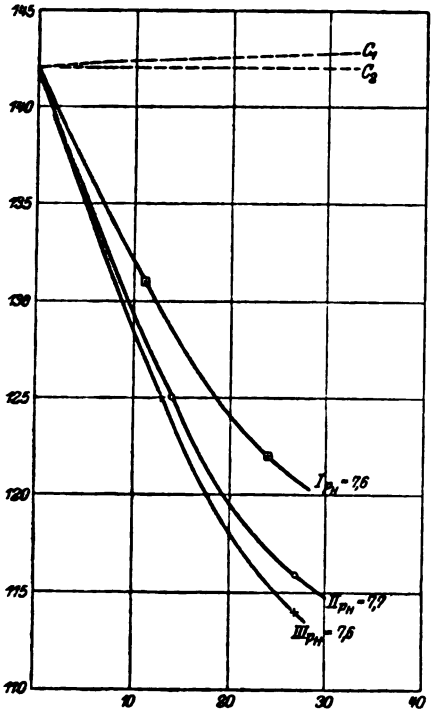


Fig. 9. Versuch mit nicht dialysiertem Pankreassaft.
I Verlauf der Spaltung ohne Salzzusatz. *II* bei Zusatz von $^1/_{10}$ mol. Na_2SO_4. *III* bei Zusatz von $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$. — C_1 Kontrollversuch mit $^1/_{10}$ mol. Na_2SO_4. C_2 Kontrollversuch mit $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$ ohne Ferment.

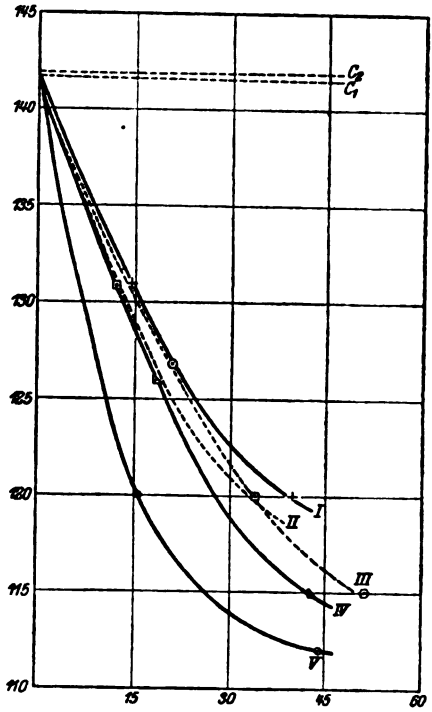


Fig. 10. Versuch mit dialysiertem Pankreasextrakt.
I Verlauf der Spaltung ohne Salzzusatz. *II* bei Zusatz von $^1/_{300}$ mol. Na_2SO_4. *III* bei Zusatz von $^1/_{300}$ mol. NaCl. *IV* bei Zusatz von $^1/_{10}$ mol. NaCl. *V* bei Zusatz von $^1/_{10}$ mol. Na_2SO_4. C_1 Kontrollversuch mit $^1/_{10}$ mol. NaCl. C_2 Kontrollversuch mit $^1/_{10}$ mol. Na_2SO_4 (ohne Ferment).

$^1/_{1200}$ und $^1/_{600}$ molar liegen alle auf derselben Linie (II—IV). Stärker war die Förderurg bei einer Konzentration von $^1/_{300}$ molar $CaCl_2$, und $^1/_{10}$ molar $CaCl_2$ (Linie VI) beschleunigte die Spaltung um etwa das Dreifache. Ist demnach die Beeinflussung der Wirksamkeit des Fermentes durch das Ca-Salz der Größenordnung

nach mit der durch die H'-Ionenkonzentration bewirkten nicht zu vergleichen, so ist sie doch bedeutend genug.

Wurde das Pankreasextrakt 8 Tage lang in Pergamenthülsen von Schleicher und Schüll gegen häufig gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert (in dem am Schluß der Dialyse weder Chlor noch Calcium nachweisbar war), so konnte eine sicher nachweisbare Verminderung der Fermentwirkung nicht

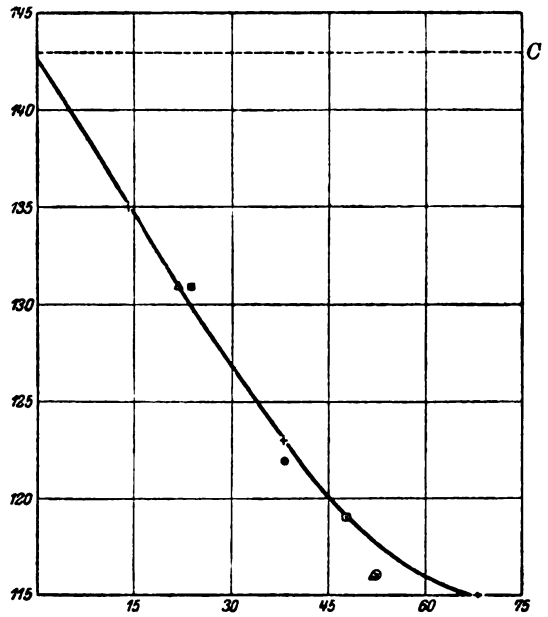


Fig. 11. Versuch mit nicht dialysiertem Blutserum. + Verlauf der Spaltung ohne Salzzusatz. ⊙ Zusatz von $CaCl_2$ zu $^1/_{10}$ mol. ⊡ Zusatz von $BaCl_2$ zu $^1/_{10}$ mol. △ Zusatz von KCl $^1/_{10}$ mol. ◔ Zusatz von NaCl zu $^1/_{10}$ mol. *C* Kontrollversuch (die gestrichelte Linie) mit aufgekochtem Serum unter Zusatz von $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$.

festgestellt werden. (Vgl. Fig. 7, Kurve I.) Auch hier konnte mit $CaCl_2$ bereits zu $^1/_{1200}$ molar eine geringe Förderung der lipolytischen Kraft beobachtet werden; ausgesprochener war diese bei $^1/_{300}$ molar $CaCl_2$ und wiederum sehr stark bei $^1/_{10}$ molar $CaCl_2$. Die Beobachtung, daß dialysierter Pankreassaft längere Zeit seine esterspaltende Fähigkeit behält, ferner, daß schon äußerst geringe $CaCl_2$-Konzentrationen die Spaltung fördern, diese fördernde Wirkung in dem Gebiet niedriger Konzentra-

tionen in einem ziemlich weiten Bereiche aber gleich bleibt und erst bei noch höheren nennenswert steigt, spräche dafür, daß Ca-Salze für die fermentative Tätigkeit zwar ungemein günstig, aber keineswegs unbedingt nötig sind. Absolut zwingend ist allerdings dieser Schluß nicht, da schon minimalste, analytisch kaum nachweisbare Spuren von Calcium, in äquivalenten Mengen mit dem Ferment verbunden, möglicherweise zur Fermentwirkung nötig sind und sich in einem nicht dialysierbaren Zustande befinden.

In Übereinstimmung mit Pekelharing u. a.[1]) konnte ferner eine befördernde Wirkung der Barium-, Magnesium- und Mangansalze konstatiert werden. Beim NaCl haben wir nur eine unwesentliche Beschleunigung finden können. (Vgl. Fig. 10.) Von der Anionenwirkung verdient der begünstigende Einfluß des SO_4-Ions hervorgehoben zu werden. Sowohl beim nicht dialysierten (Fig. 9) wie beim dialysierten Pankreasextrakt (Fig. 10) war nach Zusatz von Na_2SO_4 zu $^1/_{10}$ molar eine deutliche Beschleunigung der Spaltung zu beobachten. Dies war auch der Fall bei Anwendung von K_2SO_4.

Prüfen wir nun die Einwirkung dieser Salze auf die Esterase des Blutserums, so finden wir ein vollkommen anderes Verhalten. Während die Calciumsalze bei der Pankreaslipase so energisch fördernd wirken, finden wir beim Blutserum selbst bei $^1/_{10}$ molar $CaCl_2$ nicht die geringste fördernde Wirkung. Das nicht dialysierte Serum (Fig. 11) wie auch das 8 Tage lang gegen häufig gewechseltes destilliertes Wasser dialysierte Serum (Fig. 12 und 13) verhalten sich in dieser Richtung ganz gleich. Auch $BaCl_2$, dann Na_2SO_4, NaCl, KCl sind ohne jede fördernde Wirkung, eher läßt sich in einigen Versuchen eine ganz geringe Hemmung durch diese Salze beobachten.

Dieser Unterschied in dem Verhalten der Pankreas- und der Blutlipase spricht auch gegen die Deutung, durch die Pekelharing die fördernde Wirkung des Calciums auf die Pankreaslipase erklärt hatte. Er nimmt an, daß die Bildung der schwerlöslichen Calciumsalze der bei der Spaltung entstehenden Fettsäuren, die aus dem Reaktionsgemisch auf diese Weise entfernt würden, die Spaltung beschleunige. Bestände diese Erklärungs-

[1]) Vgl. Magnus, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 276. — Terroine, l. c.

weise zu Recht, so müßten die Ca-Ba-Salze auch bei der Blutlipase wirken, da hier dieselben Spaltprodukte entstehen.

Bemerkenswert ist der Unterschied in der Wirkung des FNa auf beide Fermente. Während, wie bereits bekannt, FNa schon in geringen Konzentrationen die Wirkung der Blutesterase

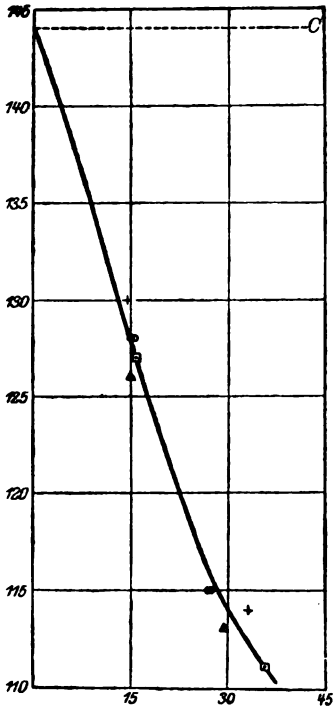


Fig. 12. Versuch mit dialysiertem Blutserum.
⊡ Verlauf der Spaltung ohne Salzzusatz. + Zusatz von $^1/_{10}$; ▲ von $^1/_{300}$; ☽ von $^1/_{1000}$; ⊙ von $^1/_{10000}$ mol. $CaCl_2$. — *C* Kontrolle mit $^1/_{10}$ mol. $CaCl_2$ ohne Ferment (die gestrichelte Linie).

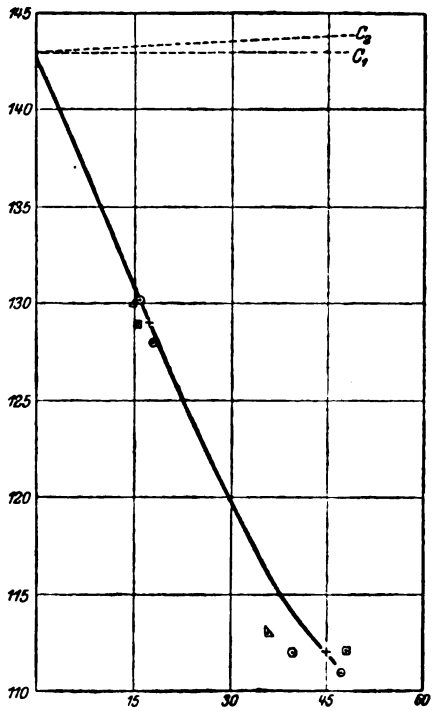


Fig. 13. Versuch mit dialysiertem Blutserum.
+ Verlauf der Spaltung ohne Salzzusatz. ⊙ Zusatz von $^1/_{10}$ mol. NaCl; ▲ von $^1/_{300}$ mol. NaCl; ⊙ von $^1/_{10}$ mol. Na_2SO_4; ⊡ von $^1/_{300}$ mol. Na_2SO_4 — C_1 Kontrolle mit $^1/_{10}$ mol. NaCl; C_2 mit $^1/_{10}$ mol. Na_2SO_4 ohne Ferment.

ganz bedeutend hemmt, ist es bei Pankreaslipase bedeutend schwächer wirksam. In Fig. 14 sind Blutserum und Pankreasextrakt von (fast) derselben Wirksamkeit auf Tributyrin miteinander verglichen. Während FNa zu $^1/_{50}$ n die spaltende Fähigkeit bei Blutlipase schon ganz bedeutend hemmt, ist es auf Pankreaslipase in dieser Konzentration fast ohne jede

Wirkung. FNa zu $^1/_{10}$ n hemmt die Blutlipase bereits vollkommen, die Pankreaslipase relativ schwach, viel schwächer als $^1/_{50}$ n-FNa die Blutlipase.

Schließlich haben wir untersucht, wie die beiden Fermente sich gegen Fällungsmittel, Kaolin und Eisenhydroxyd, verhalten. In dieser Richtung ergaben sich keine Unterschiede: beide Fermente werden sowohl durch Kaolin als durch Eisenhydroxyd adsorbiert. Das Ferment entfaltet seine Wirkung auch in adsorbiertem Zustande.

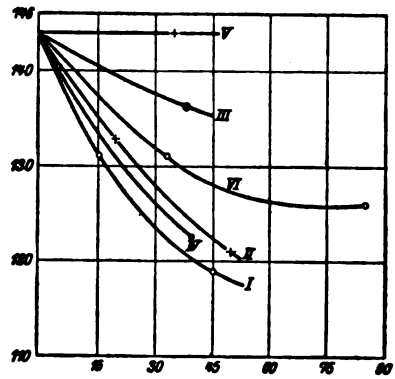


Fig. 14. *I* Verlauf der Spaltung mit Pankreaslipase ohne FNa. *II* Verlauf der Spaltung mit Blutlipase ohne FNa. *III* Blutlipase mit $^1/_{50}$ n-FNa. *IV* Pankreaslipase mit $^1/_{50}$ n-FNa. *V* Blutlipase mit $^1/_{10}$ n-FNa. *VI* Pankreaslipase mit $^1/_{10}$ n-FNa.

Zusammenfassend können wir demnach sagen, daß die Pankreaslipase und die Blut- (resp. Serum-)lipase in vielen wichtigen Eigenschaften differieren, so daß beide Fermente nicht als identisch angesehen werden können. Das Optimum der Wirkung der Pankreaslipase liegt bei einer etwas alkalischeren Reaktion ($p_H = 8{,}3$ bis 9) als das der Blutlipase ($p_H = 8$). Die Wirkung der Pankreaslipase wird durch Calcium-, Barium-, Magnesium-, Mangansalze gefördert, während diese Salze auf die Blutlipase ohne Wirkung sind. FNa hemmt die Wirkung der Blutlipase um vieles stärker als die der Pankreaslipase. Es scheint auch nach den Löslichkeitsverhältnissen dieser Fermente, daß die Pankreaslipase im heterogenen, die Blutlipase (resp. Esterase) im homogenen System ihre Wirksamkeit entfaltet.

Über die Ernährung von Mäusen mit einer aus einfachen Nahrungsstoffen zusammengesetzten Nahrung.

Von

F. Röhmann.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 28. April 1914.)

Mit 23 Figuren im Text.

In den Jahren 1896 bis 1901 hatte ich zusammen mit einer Anzahl von Mitarbeitern eine Reihe von Stoffwechselversuchen an Hunden angestellt, um zu untersuchen, ob der Nährwert von phosphorhaltigen Eiweißkörpern ein anderer sei, als der von phosphorfreien. Als phosphorhaltige Eiweißkörper dienten Casein und Vitellin, als phosphorfreie Eiweißkörper Myosin und besonders Edestin, auf das ich von Lafayette B. Mendel, der damals mit mir zusammen arbeitete, hingewiesen worden war.

Die Versuche befriedigten mich aber nicht, und zwar besonders deswegen nicht, weil sich an den Hunden mit dem Edestin enthaltenden Nahrungsgemische nur kurze Versuchsreihen durchführen ließen. Die Hunde verweigerten nach einigen Tagen die Aufnahme der Nahrung. Der Grund hierfür konnte entweder darin liegen, daß das Edestin von den Hunden schlecht vertragen wurde, oder daß das Verhältnis zwischen Edestin und den anderen Bestandteilen der Nahrung nicht zweckmäßig gewählt war. Man hätte nun versuchen können, bei Hunden durch Probieren ein richtiges Mischungsverhältnis zu finden. Das verbot sich aber durch die Kostspieligkeit des zur Fütterung dienenden Eiweißstoffes. Ich beschloß deshalb, zu den Versuchen weiße Mäuse zu nehmen. So kleine Tiere schienen auch den Vorteil zu bieten, daß ihr Stoff-

wechsel ein verhältnismäßig reger und ihre Lebens- und Entwicklungszeit kürzer ist, die Einflüsse der Nahrung sich also schneller und deutlicher zeigen konnten als bei größeren Tieren. Die Mäuse sollten mit einem Futter ernährt werden, das aus den einfachen Nahrungsstoffen Eiweiß, Fetten, Kohlenhydraten und Salzen zusammengesetzt war. Ein solches Futter sollte mit verschiedenen Eiweißstoffen hergestellt werden, um zu sehen, ob die verschiedenen Eiweißstoffe den gleichen oder einen verschiedenen Einfluß auf die Ernährung haben.

Ich ging also bei diesen Versuchen von der Voraussetzung aus, daß es möglich sei, Mäuse mit einem aus den einfachen Nahrungsstoffen zusammengesetzten Futtergemisch mindestens für lange Zeiten zu ernähren. Diese Voraussetzung war berechtigt, da ja schon unsere Versuche an ausgewachsenen Hunden gezeigt hatten, daß man Tiere mit einem Futtergemisch, das nur Casein, Stärke, Fett und Salze enthielt, wochenlang bei bestem Wohlsein erhalten kann. Ja, ich sah keinen Grund, warum es nicht möglich sein sollte, Tiere auch auf die Dauer mit einem solchen Nahrungsgemisch zu erhalten. Was bisher an derartigen Versuchen[1]) vorlag, schien mir nicht gegen eine solche Möglichkeit zu sprechen.

Diese Versuche führten ganz von selbst zu einer Erweiterung der Aufgabe. Schon bevor ich die Versuche mit Mäusen begann, hatte ich zusammen mit Franz Steinitz versucht, ganz junge Hunde mit einer aus den einfachen Nahrungsstoffen bestehenden Nahrung aufzuziehen, ebenfalls zu dem Zwecke, den Wert von phosphorhaltigem und phosphorfreiem Eiweiß zu vergleichen. Versuche mit sich entwickelnden Tieren schienen für die Beurteilung des Wertes einer Nahrung ganz besonders geeignet. Es gelang, ganz junge Hunde mit einem Gemisch von Casein, „Nucleoproteid der Leber", Milchzucker, Fett und Salzen eine bestimmte Zeit am Leben zu erhalten und Gewichtszunahme zu erzielen. Die Versuche wurden aber nicht fortgesetzt, da die Beschaffung des nötigen Tiermaterials naturgemäß Schwierigkeiten macht und die Pflege der Tiere viel

[1]) Siehe Franz Steinitz, Über Versuche mit künstlicher Ernährung. Inaug.-Diss. Breslau 1900. — Thomas B. Osborne and Lafayette B. Mendel, Feeding experiments with isolated food-substances. Carnegie Institution of Washington. Public. 156, 1911.

Mühe erfordert. Jetzt zeigte sich bei den Versuchen mit Mäusen, daß eine Nahrung, die zur dauernden Erhaltung älterer und besonders ausgewachsener Tiere sehr wohl geeignet ist, nicht genügt zur Aufzucht wachsender Tiere. In vielen Fällen wuchsen die Tiere eine Zeitlang, dann trat mehr oder weniger langdauernder Wachstumsstillstand ein. Die Tiere gingen zugrunde, sie ließen sich aber erhalten und wuchsen sofort, wenn man sie zu natürlicher Nahrung setzte. Hier lag eine Schwierigkeit, die überwunden werden mußte, bei deren Überwindung aber unsere Geduld und Ausdauer zeitweise auf eine harte Probe gestellt wurde. Es fehlten alle Anhaltspunkte, um zu erkennen, wo die Fehler der Nahrung lagen. Man war auf Probieren angewiesen. Die Versuche waren sehr langwierig und hatten mit einer Reihe äußerer Schwierigkeiten zu kämpfen. Im Laufe der Zeit gelang es aber, auch wachsende Tiere mit einem aus den einfachen Nahrungsstoffen zusammengesetzten Nahrungsgemisch aufzuziehen, wobei es sich zeigte, daß gewisse, bisher kaum beachtete Umstände bei der Ernährung besonders jugendlicher Tiere eine wesentliche Rolle spielen können.

Reihe I[1]).

Wie sollte eine Nahrung zusammengesetzt sein, die sich für die Ernährung von Mäusen eignete? Nach der Lehre vom Stoffwechsel wissen wir, daß jede Nahrung eine gewisse Menge Eiweiß, und neben diesem eine gewisse Menge von Kohlenhydraten, Fetten und Salzen enthalten muß. Ob Lecithin und Nucleinsäuren, Purine u. a. wesentliche Bestandteile der Nahrung sind, ließ sich nicht sagen. Auch über die Form, in der das Eisen zugeführt werden muß oder zugeführt werden darf, herrschte noch keine Sicherheit. Die weit verbreitete Annahme, daß zur Ernährung irgendwelche Geschmacks- oder Riechstoffe erforderlich sind, glaubte ich unberücksichtigt lassen zu können.

Ein günstiger Umstand war es, daß infolge der Isodynamie das Mengenverhältnis zwischen Eiweiß, Fetten und Kohlenhydraten innerhalb gewisser Breiten schwanken durfte. Auch die Wahl der Kohlenhydrate machte keine Schwierigkeiten.

---

[1]) Vgl. F. Röhmann, Über künstliche Ernährung. Vortrag, gehalten auf der 74. Versamml. Deutsch. Naturf. u. Ärzte in Karlsbad 1902. Klin.-ther. Wochenschr. 1902, Nr. 40.

In allen Versuchen wurde Kartoffel- und Weizenstärke verwendet. Die erstere durchlief den Darmkanal der Mäuse zum Teil ungenutzt und diente zugleich als kotbildende Substanz anstatt der Cellulose der natürlichen Nahrung. Auch die Wahl des Fettes erschien uns zunächst gleichgültig. Es wurde „Margarine" verwendet. Schwieriger war die Frage der Wahl des Eiweißes.

Leicht zugängig sind die tierischen Eiweißstoffe wie Hühnereiweiß, Casein und Vitellin. Über das Bedenken, diese für die Ernährung von Mäusen zu verwenden, konnte man sich hinwegsetzen mit der Erwägung, daß erfahrungsgemäß Mensch und Tier die verschiedensten Eiweißstoffe des Tier- und Pflanzenreichs in ihrer Nahrung zu verwerten vermögen. Gelangen die Versuche mit diesen Eiweißstoffen nicht, so mußten eben andere geprüft werden. Wir begannen unsere Versuche mit einem Gemisch von Hühnereiweiß, Casein und Vitellin, damit die Nahrung Vertreter verschiedener Eiweißgruppen enthielte: Hühnereiweiß als Gemenge von Albumin, Globulin und Mucoid, Casein als phosphorhaltigen und Vitellin als phosphor- und eisenhaltigen Eiweißstoff. Das Hühnereiweiß war das käufliche Albumen ovi siccum. Das Casein wurde uns in dankenswerter Weise von den Farbwerken vorm. Meister, Lucius & Brüning zu Höchst a. M. zur Verfügung gestellt, ebenso wie das in einigen Versuchen verwendete Edestin. Das Vitellin wurde durch Fällen von Eigelb mit Alkohol, Auskochen mit Alkohol und Extrahieren mit Äther gewonnen. Der in Alkoholäther lösliche Teil des Eigelb fand in einer Reihe von Versuchen als „Eifett" Verwendung.

In einer Anzahl von Versuchen wurde dem Futter „Nucleoproteid" hinzugefügt. Es war dies der Niederschlag, der aus einem Wasserextrakt der Kalbsleber durch vorsichtigen Säurezusatz abgeschieden, dann abfiltriert und mit Alkohol und Äther in ein trockenes Pulver verwandelt worden war.

Die Salze bestanden aus einem Gemisch von 10 g phosphorsaurem Kalk, 40 g saurem phosphorsaurem Kalium, 20 g Chlornatrium, 15 g citronensaurem Natrium, 8 g citronensaurem Magnesium, 8 g milchsaurem Calcium. Die organischen Salze sollten dazu dienen, unter Übergang in kohlensaure Salze die Säuren, Schwefel- und Phosphorsäure, die sich im Stoffwechsel

bei der Oxydation der Eiweißstoffe bilden, zu neutralisieren. Dieser gar nicht unwesentliche Kunstgriff war schon früher von mir in den Stoffwechselversuchen an Hunden angewendet worden und wurde seitdem wiederholt auch von anderer Seite als etwas Selbstverständliches benutzt.

Bei der Wahl des Mischungsverhältnisses dieser Nahrungsstoffe wurde ausgegangen von der Zusammensetzung des Getreides. Der Hafer, mit dem sich Mäuse sehr gut lange Zeit ernähren lassen, enthält im Mittel 12,11% Wasser, 10,66% stickstoffhaltige, 58,37% stickstofffreie Substanz, 4,99% Rohfett, 10,58% Rohfaser und 3,29% Asche. Bei Roggen, Gerste und Weizen ist die Menge der stickstofffreien Substanz noch größer, die des Fettes und der Aschenbestandteile geringer.

Diesem Verhältnis entsprach annähernd das zuerst angewendete Futtergemisch aus 12 g Casein, 4 g Hühnereiweiß, 4 g „Nucleoproteid", 180 g Kartoffelstärke, 12 g Margarine, 4 g Salz. Es enthielt 10% Eiweiß, 82,5% Stärke, 5,8% Fett, 1,8% Salze.

Mit ihm blieben in Versuch 1 4 Mäuse während 51 Tagen auf ihrem Gewicht, eine starb nach 38 Tagen. In Versuch 3 starb eine Maus nach 49 Tagen, eine zweite nach 75 Tagen. Bei letzterer trat nach 59 Tagen Gewichtsabnahme ein. In Versuch 10 starb eine Maus nach 42, eine zweite nach 45, eine dritte nach 57 Tagen. Zwei hielten sich länger als 86 Tage auf ihrem Körpergewicht, sahen aber am Ende des Versuchs sehr struppig aus. Obgleich dieses Futter also die wesentlichen Nahrungsstoffe enthielt, so genügte es doch nicht für die Dauer. Dies zeigte sich auch in dem Verhalten junger, nicht ausgewachsener Mäuse.

In Versuch 3 wurden mit den zwei alten Mäusen gleichzeitig drei von ihnen geworfene Junge gefüttert. Von diesen starb das eine nach 21 Tagen, die beiden anderen lebten länger als 24 Tage. Sie wogen am 13. Tage der künstlichen Fütterung je 6,4 g, erreichten aber nur ein Höchstgewicht von 14,5 g nach 62 Tagen.

In Versuch 10 wurden mit den alten sechs junge Mäuse gefüttert, von denen jede Maus zu Beginn der künstlichen Fütterung 8,6 g wog. Eine dieser Mäuse starb nach 35, eine zweite nach 83 Tagen, die vier anderen lebten länger. Das Höchstgewicht wurde innerhalb 57 Tagen erreicht, es betrug aber nur 16,6 g, während normale Mäuse 20 bis 25 g wogen.

Immerhin wuchsen junge Mäuse bei diesem Futter, wenn auch erheblich langsamer als die mit einem natürlichen Futter, z. B. Milch und Semmel, ernährten Mäuse.

Ein sehr ähnliches Verhalten zeigten die Mäuse, wenn im Futtergemisch das Nucleoproteid durch Vitellin ersetzt wurde.

In Versuch 7 starb je eine Maus nach 52, 68, 72, 84 und 91 Tagen, in Versuch 8 nach 37, 90 und 93 Tagen, eine war nach 96 Tagen dem Tode nahe. Junge Mäuse wuchsen auch bei diesem Futter wieder langsamer als bei normalem; dann trat Wachstumsstillstand ein und nach einiger Zeit starben die Tiere.

Ein teilweiser Ersatz der Margarine durch Eifett — das Futtergemisch enthielt Vitellin wie in den vorhergehenden Versuchen, und statt 12 g Margarine nur 9 g Margarine und 9 g Eifett — wirkte auf alte Mäuse ungünstig. Von sechs ausgewachsenen Mäusen starben fünf nach 9, 24, 40, 46 und 68 Tagen.

Von sechs jungen Mäusen starb eine nach 31, eine zweite nach 43 Tagen. Die vier anderen nahmen bis zum 56. Tage sehr langsam an Gewicht zu, von 11,5 auf 18,2 g. Dann trat bis zum 68. Tage Gewichtsabnahme auf 16,5 g ein.

Sehr auffallend war es, daß in allen diesen Versuchen, mit Ausnahme des einen in Versuchsreihe 3, der Tod eintrat, ohne daß zuvor eine Abnahme des Körpergewichts erfolgte. An einem Tage zeigten die Mäuse noch ein vollkommen normales Verhalten. Am folgenden Tage erschienen sie auffallend schwach, sie saßen ruhig mit etwas gesenktem Kopfe da und schienen schneller zu atmen. Wenn sie sich bewegten, war ihr Gang taumelnd. Die Beine, deren Zehen etwas gespreizt erschienen, glitten seitlich fort. Freßlust war noch vorhanden. Wurden die Mäuse in diesem Zustand zu natürlichem Futter gesetzt, so machten sie sich schnell über dieses her und erholten sich im Laufe eines Tages vollkommen. Ließ man sie bei künstlichem Futter, so trat unfehlbar nach 1 bis 2 Tagen der Tod ein. Die Sektion ergab keine krankhaften Veränderungen der inneren Organe, nur war es auffallend, daß jede sichtbare Menge von Fett verschwunden war.

Es kam daher der Verdacht auf, daß die stickstofffreien Substanzen der Nahrung dem Nahrungsbedürfnis nicht genügten.

Die Menge des Fettes erschien im Hinblick auf den Fettgehalt des normalen Futters ausreichend. Aber für die Stärke war es möglich, daß ihre Darreichung in Form der schwerer verdaulichen Kartoffelstärke nicht zweckmäßig war. Die Mäuse bildeten reichliche Mengen von weißlichem Kot, der viel unverdaute Stärke enthielt und von den Mäusen selbst gefressen wurde. Es wurde deshalb ein Teil der Kartoffelstärke durch Weizenstärke ersetzt.

Das Futtergemisch hatte jetzt folgende Zusammensetzung: 14 g Casein, 4 g Hühnereiweiß, 4 g Vitellin, 60 g Kartoffelstärke, 120 g Weizenstärke, 19 g Margarine, 4 g Salze.

Mit diesem Futter wurden in Versuch 14 5 Mäuse vom 24. XII. 1901 bis 27. III. 1902 gefüttert. An diesem Tage wurde ein Bock fortgenommen. Die anderen 4 Mäuse wurden noch weiter bis zum 21. IV. 1902, also fast 4 Monate lang gefüttert, wo der Versuch abgebrochen wurde. Das Gewicht der 4 Mäuse betrug an diesem Tage 99,5 g. Während dieses Versuches wurden 7 mal Junge zur Welt gebracht, aber nur vom ersten Wurf (2. I. 1902) blieben 7 Junge am Leben. Die anderen wurden stets totgebissen und gefressen, sofern nicht die Leichen alsbald aus dem Käfig entfernt wurden. Diese 7 Jungen wogen am 20. I. 1902 zusammen 34 g. Ihr Gewicht von 4,8 g war sehr gering geblieben im Vergleich zum Gewichte anderer, natürlich gefütterter Mäuse, die am 19. Tage 7,1 g wogen. Von diesen 7 lebten am 27. I. 1902 noch 5, zusammen 20 g schwer, am 30. I. noch 3, 13 g schwer, am 6. II. 2, 8 g schwer, am 6. II. 1, 5 g schwer. Dieses starb am 18. II. 1902.

Bei obiger Nahrung erhielten sich also ausgewachsene Mäuse dauernd auf ihrem Körpergewicht und erzeugten Junge. Es gelang aber nicht, die letzteren mit dieser Nahrung aufzuziehen. Die jungen Mäuse waren innerhalb 19 Tagen nur auf durchschnittlich 4,8 g gewachsen. Eine der jungen Mäuse wog nach 45 Tagen noch immer nur 5 g. Es war also die Erscheinung eines langdauernden Wachstumsstillstandes beobachtet worden, dem wir im folgenden wiederholt begegnen werden.

Die gute Wirkung, die der teilweise Ersatz der Kartoffelstärke durch Weizenstärke hatte, bestärkte mich in der An-

nahme, daß das Unzureichende der ersten Nahrung darauf beruhte, daß die Stärke infolge ungenügender Saccharifikation nicht genügend im Darm ausgenutzt wurde. Genügte jetzt das Gemisch von Kartoffel- und Weizenstärke für die alten Mäuse, so war es doch, wie wir sahen, für das größere Nahrungsbedürfnis der wachsenden Tiere nicht ausreichend. Um ihm Rechnung zu tragen, wurden zu dem letzterwähnten Gemisch noch 27 g Malz (Brunnengräber-Rostock) hinzugefügt.

Dieses Futter wurde in Versuch 11 an eine alte Maus und 4 junge Mäuse verabreicht, die vom 4. XI. 1901 bis 11. I. 1902, also 68 Tage, mit dem obenerwähnten, Eifett enthaltenden Gemisch gefüttert worden waren. Unter dem Einfluß des neuen Fettes blieb das Gewicht der alten Maus unverändert; das der 4 Jungen, das vorher abzunehmen begonnen hatte, stieg innerhalb 20 Tagen von durchschnittlich 16,9 g auf 23 g.

Am 6. II. 1902 warf eine der jungen Mäuse 10 Junge, von denen 4 am 19. II. aufgefressen waren. Eine andere Maus warf am 28. II. Die Jungen wurden aufgefressen. Dasselbe geschah am 6. III. Am 15. III. wurden wieder 6 Junge geworfen, die am Leben blieben. Am 24. III. wurden wahrscheinlich auch Junge geworfen und gefressen. Letzteres geschah ferner am 30. III. und 24. IV.

Der Zusatz von Malz hatte sich also gut bewährt: 5 Mäuse, 1 alte und 4 junge, waren 177 Tage künstlich ernährt worden. Sie wogen am Ende des Versuchs durchschnittlich 25 g. Während dieser Fütterungsreihe hatten sie wiederholt lebensfähige Junge zur Welt gebracht.

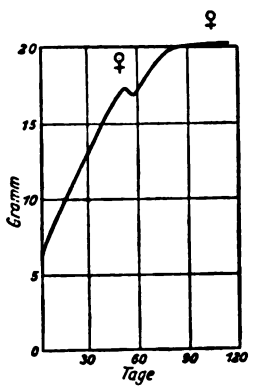


Fig. 1. Casein—Vitellin—Hühnereiweiß—Malz.

Der günstige Einfluß des Malzzusatzes zur Nahrung zeigte sich, als zwei dieser Mäuse dasselbe Futter ohne Malzzusatz erhielten. Das Körpergewicht sank. Es betrug am 11. IV. 51 g, am 14. IV. 48 g, am 17. IV. 38 g, am 21. IV. 37 g. Bei Darreichung des malzhaltigen Futters stieg das Körpergewicht wieder: am 24. IV. 39 g, am 27. IV. 44 g, am 30. IV. 44,5 g. Vom 7. bis 26. V. schwankte es zwischen 42 uud 45 g.

Im ganzen waren diese 2 Mäuse 203 Tage künstlich ernährt worden.

Der günstige Einfluß des Malzes ergab sich weiterhin auch daraus, daß es gelang, mit der künstlichen Nahrung den Wurf vom 6. II. 1902 aufzuziehen. Die allmähliche Gewichtszunahme ist aus der folgenden Kurve[1]) zu ersehen.

Zum Vergleich mögen die folgenden Kurven dienen, die das Wachstum von Mäusen zeigen, die mit Milch, Semmel und Hafer aufgezogen wurden.

Versuch R. VII. 12.

3 kleine Mäuse (I) wiegen am 14. IX. 1911 21 g, am 1. XI. 53 g, am 1. XII. 57 g, 27. I. 1912 64 g. 3 andere Mäuse (II) wiegen am 27. IX. 11 g; am 1. XI. 30 g, am 1. XII. 35 g.

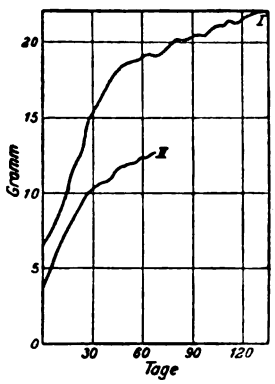


Fig. 2.
Milch und Semmel.

Man sieht, daß die künstlich ernährten Mäuse ebenso schnell wuchsen wie die natürlich ernährten. Diese von künstlich ernährten Eltern erzeugten und bei künstlicher Ernährung aufgezogenen Mäuse wurden geschlechtsreif.

Eine dieser Mäuse warf am 21. IV. Die Jungen wurden aber alsbald gefressen. Am 23. V. warf wiederum eine dieser Mäuse, aber, nach dem Aussehen des Wurfes zu urteilen, anscheinend zu früh.

Der Wurf vom 15. III. ließ sich mit demselben Futter nicht aufziehen. Die 6 Jungen wogen am 11. IV. zusammen nur 25 g, am 27. IV. 34 g. Sie waren also langsam gewachsen. Jetzt trat Wachstumsstillstand ein und allmählich starb eine junge Maus nach der anderen.

In sehr ähnlicher Weise verlief der folgende Versuch.

Versuch R. I. 28.

4 ausgewachsene Mäuse (I) erhielten vom 14. VIII. bis 18. X. 1902 (65 Tage) dasselbe Futter mit Malz wie die Tiere des vorhergehenden Versuchs, dann vom 18. X. bis 19. XI. (32 Tage) dasselbe Futter ohne Malz mit 5 g Fleischextrakt, vom 19. XI. bis 4. XII. (15 Tage) Malz, das durch Dialyse von Zucker u. a. befreit war, vom 4. XII. bis 2. I. 1903 (29 Tage) wieder 20 g Malz. Bei dieser Ernährung bleiben die

[1]) Hier und im folgenden stellen die Kurven das Durchschnittsgewicht der Mäuse dar. ♀ bedeutet, daß eine Maus geworfen hat.

Mäuse auf ihrem Körpergewicht. Eine starb nach 34 Tagen. Die Mäuse warfen wiederholt lebende Junge. Es ließ sich aber nur der Wurf, der am ersten Tage nach Beginn der künstlichen Fütterung geboren war, aufziehen.

Die 5 Jungen (II) erhielten vom 15. VIII. bis 14. I. 1903 das Futtergemisch mit Malz. Sie entwickeln sich hierbei sehr ungleichmäßig. Das Gewicht der 5 Tiere war am 12. X., also nach 42 Tagen, 8 g, 9 g, 10,5 g, 14,5 g, 15,5 g. Das kleinste Tier ging am 20. X. ein. Die anderen Mäuse wurden geschlechtsreif. Eine warf am 10. XI. Dieser Wurf war am 22. XI. aufgefressen. Am 6. XII. erfolgte ein neuer Wurf. Von diesem hielt sich ein Junges gut bis zum 22. XII. mit einem Gewicht von 7 g. Am 26. XII. waren wieder 3 Junge geworfen. Zwei von diesen waren am 16. I. behaart und sahen, waren aber ganz außergewöhnlich klein. Sie wogen zusammen nur 5,5 g.

Bei einem weiteren Versuch, der mit 4 Mäusen und demselben Futter angestellt wurde, hielten sich die Mäuse ebenfalls dauernd auf ihrem Gewicht. Sie warfen wiederholt. Der Versuch wurde aber nach 94 Tagen abgebrochen, da die jungen Würfe stets gefressen wurden.

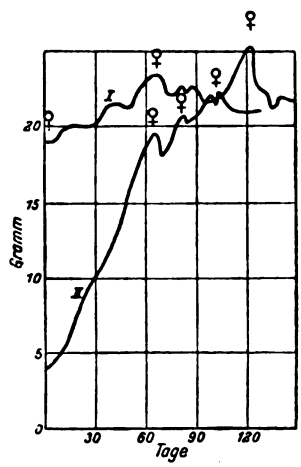


Fig. 3. Kasein- Vitellin- Hühnereiweiß- Malz.

Durch diese Versuche war zum ersten Male — im Jahre 1901/02 — bewiesen, daß es gelingt, Tiere mit einem Futter, das willkürlich aus einfachen Nahrungsstoffen — Eiweiß, Kohlenhydraten, Fetten und Salzen — zusammengesetzt ist, dauernd am Leben zu erhalten. Es gelang auch bei Zusatz von Malz junge Mäuse und selbst solche, die von künstlich ernährten Eltern geboren worden waren, bis zur Geschlechtsreife aufzuziehen. Die von diesen geborenen Jungen ließen sich aber mit der künstlichen Nahrung nicht auf die Dauer am Leben erhalten.

Es wurden nun weiter noch einige Versuche angestellt, in denen das Futter dieselben Mengen von Kohlenhydraten, Fett und Salzen und im ganzen auch dieselbe Menge von Eiweiß enthielt, die Art des Eiweißes aber verändert wurde.

In Versuch 22 erhielten 4 ausgewachsene Mäuse nur Hühnereiweiß. Das Gewicht blieb zunächst 12 Tage unver-

ändert — 82 bis 84 g — nahm dann aber stetig ab. Es sank innerhalb weiterer 21 Tage auf 71 g.

In Versuch 21 erhielten 5 Mäuse Edestin und Hühnereiweiß, und zwar in obigem Gemisch von ersterem 18, von letzterem 4 g. Das Gewicht der Mäuse blieb vom 23. V. bis 5. VII. 1902, also 42 Tage unverändert und sank dann bis zum 11. VII. von 87 auf 82 g.

In einem zweiten ebensolchen Versuch hielten sich junge Mäuse während 74 Tagen auf ihrem Körpergewicht.

In Versuch 15 wurde an eine alte, und 4 junge Mäuse, statt Vitellin das Nucleoproteid der Leber gefüttert. Die jungen Mäuse nahmen an Gewicht zu und schienen sich auf diesem zu halten.

Mit demselben Futter gelang es aber in Versuch 20 nicht, junge Mäuse, die 5,5 g wogen, aufzuziehen. Nucleoproteid schien also keinen Vorzug vor Vitellin zu besitzen.

Reihe II.

Mit dem Futtergemisch, das in der Reihe I angewendet worden war, war es, wie wir sahen, möglich junge Mäuse aufzuziehen. Aber es hatte doch offenbar noch Mängel. Einmal wuchsen die Jungen nur sehr langsam, sie blieben auch im Durchschnitt etwas kleiner als normale Mäuse. Ihre Nachkommen ließen sich auch nicht mit Sicherheit aufziehen. Weiter aber befand sich im Futtergemisch auch Malz, also ein Gemisch, das zwar überwiegend aus Kohlenhydraten bestand, aber auch gewisse unbekannte Produkte enthielt. Die Bemühungen mußten darauf gerichtet sein, diese Mängel zu beseitigen.

Dies geschah zunächst in der Weise, daß zu dem Futtergemisch kein Malz hinzugesetzt, dafür aber die Menge der Margarine von 38 auf 45 g erhöht wurde. Der Erfolg war kein befriedigender, trotzdem die Versuche nach verschiedener Richtung hin abgeändert wurden.

Angeführt sei der folgende Versuch, weil er wieder in sehr deutlicher Weise einen lange andauernden Wachstumsstillstand unter dem Einfluß der unzureichenden Ernährung zeigt und das sofortige Einsetzen des Wachstums beim Übergang zur natürlichen Nahrung (Milch und Semmel).

Versuch R. II. 30.

4 junge Mäuse erhalten ein Futter aus 14 g Casein, 4 g Vitellin, 4 g Hühnereiweiß, 60 g Kartoffelstärke, 120 g Weizenstärke, 15 g Margarine, 4 g Salze, dazu vom 31. X. bis 19. XI. 1902 5 g Fleischextrakt. Das Gewicht steigt vorübergehend von 27,5 auf 33 g und sinkt auf 28 g. Vom 18. X. bis 4. XI. wird noch dialysiertes Malz, von da bis zum 10. XI. wurden 20 g Malz hinzugesetzt, am 11. XII. 1902 erfolgt Übergang zu gewöhnlichem Futter. Am 4. XII. stirbt eine Maus. Das Gewicht der Mäuse änderte sich vom 16. XI. bis 10. XII. nicht. Vom 11. XI. bis 2. I. stieg das Gewicht der Mäuse unter dem Einfluß der natürlichen Ernährung von 23 auf 44 g.

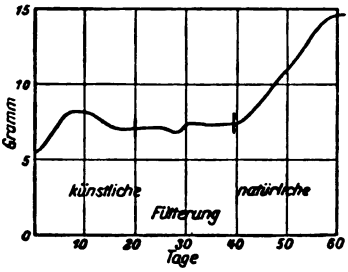


Fig. 4.

In anderen Versuchen wurde das Verhältnis von Casein, Hühnereiweiß und Vitellin verändert, Nucleoproteid der Leber hinzugesetzt, die Gesamtmenge des Eiweißes vermindert, alles ohne Erfolg.

Es wurden auch zwei Versuche angestellt, in denen als Eiweiß Fleisch verfüttert wurde, das fein gemahlen auf dem Wasserbade getrocknet und dann pulverisiert worden war. Das Futter enthielt 76 g Fleischpulver, 180 g Kartoffelstärke, 300 g Weizenstärke, 45 g Margarine, 1,5 g citronensaures Natrium, 0,8 g citronensaures Magnesium, 0,8 g milchsauren Kalk, 2,0 g Chlornatrium. Mit diesem Futter ließen sich junge Mäuse nicht aufziehen. Bei 2 Mäusen hielt sich das Gewicht vom 23. II. bis 23. III. 1903 auf 25—27—26 g und sank dann bis zum 5. IV. auf 21 g, 4 andere Mäuse wogen am 8. IV. 23 g, am 27. IV. 32 g, am 27. IV. 27 g, am 7. V. 24,5 g.

Als vorteilhaft erwies sich dagegen ein Futtergemisch, in dem statt Vitellin das Gelbe eines frischen Eies enthalten war. Das Futter bestand aus 42 g Casein, 12 g Hühnereiweiß, 180 g Kartoffel- und 360 g Weizenstärke, 45 g Margarine, 12 g Salze und 1 Gelbei.

Es gelang, junge Mäuse bis zur Geschlechtsreife in der aus der Kurve

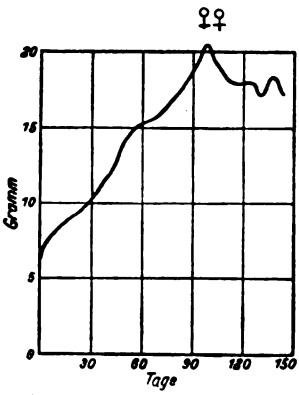


Fig. 5. Casein—Hühnereiweiß—Gelbei.

ersichtlichen Weise aufzuziehen. Die von diesen Tieren geworfenen Jungen blieben jedoch auffallend klein. Vom 23. bis 33. Tage blieb bei dem einen Wurf das Gewicht 3 bis 4 g, ebenso beim anderen vom 19. bis 36. Tage 3 bis 3,5 g. Eine weitere Vermehrung des Gelbeies wirkte ungünstig.

Reihe III.

Das Futter, das bisher verabreicht wurde, stellte stets ein feines trockenes Pulver dar. Es wurde in den Käfigen in entsprechend hochwandigen Gefäßen aufgestellt, so daß zwar ein Verstreuen des Pulvers vermieden, aber nicht verhindert werden konnte, daß die Mäuse das Futter, in dem sie saßen, durch ihre Exkremente verunreinigten, was natürlich zu einer entsprechend häufigen Erneuerung des im übrigen ja nicht kostspieligen Futters zwang. Es wurden verschiedene Versuche gemacht, diesem Übelstande abzuhelfen. Schließlich kam ich auf den Gedanken, das Futter zu backen. Das Backen hatte aber noch einen weiteren wichtigen Vorteil. Die Versuche in Reihe I und II hatten uns beiläufig gezeigt, wie von der Menge und der Art, in der die stickstofffreien Bestandteile dargeboten werden, der Nährwert der Nahrung beeinflußt wird. Insbesondere deutlich war ein günstiger Einfluß des Malzzusatzes zu erkennen gewesen. Malz enthält die Saccharifikationsprodukte der Stärke. Auch beim Backen wird die Stärke durch die von der Hefe ausgehende Diastasierung aufgeschlossen, und durch die beim Backen erfolgende Erhitzung wird die bis dahin rohe Stärke, soweit sie nicht durch die Hefe dextriniert worden ist, unter dem Einfluß von Wasser und Hitze verkleistert, d. h. in lösliche Stärke übergeführt, die, weil nicht mehr von Stärkecellulose umhüllt, der Einwirkung der Verdauungssäfte leichter zugängig ist als die rohe Stärke. Es war also vom Backen eine Erhöhung des Nährwertes unserer Futtergemische zu erwarten. Und diese Erwartung bestätigte sich. Das Verfahren war sehr einfach. Das Futtergemisch wurde mit etwas Wasser und Hefe zu einem Teig angerührt, in halbkugelige, mit etwas Fett ausgestrichene Metallschalen gebracht und für einige Zeit in den Brutschrank gestellt. War die Gärung eingetreten, war der Teig „gegangen“, so wurde er im Luftbade etwa $1^1/_2$ Stunde auf etwa 125^0 erhitzt.

Es wurde folgendes Gemisch hergestellt: 14 g Casein, 4 g Hühnereiweiß, 60 g Kartoffelstärke, 120 g Weizenstärke, 10 g Traubenzucker, 7 g Margarine, 4 g Salze, 3 Gelbeier. Casein, Hühnereiweiß, Kartoffel- und Weizenstärke sind in ihm in gleicher Menge enthalten wie früher, die Menge der Margarine ist auf mehr als die Hälfte vermindert, es fehlt das Vitellin. Dafür sind 10 g Traubenzucker und 3 Gelbeier hinzugesetzt. Dieses Futter stellte nach dem Backen mit Hefe ein auch zum Aufziehen von jungen Mäusen geeignetes Futter dar.

Zu Versuch R. III. 11 diente eine alte Maus (I). Beginn der Fütterung am 27. II. 1906. Sie warf am 6. III. 6 Junge, von denen 4 zur Aufzucht dienten (I a). Diese wogen am 8. III. zusammen 9,5 g.

Versuch R. III. 13 wurde am 14. IV. 1906 mit 4 jungen Mäusen (II) begonnen, welche von Eltern geboren waren, die dasselbe Futter (gebacken) erhalten hatten und bis zum Beginn dieses Versuches ebenfalls schon mit demselben Gebäck aufgezogen worden waren. Jetzt wurde das Gemisch zunächst nicht gebacken.

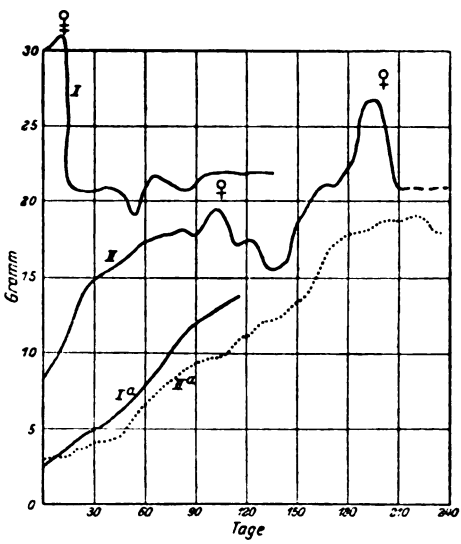


Fig. 6. Casein — Hühnereiweiß — Gelbei.

Es enthielt aber auf 75 g 2,5 g trockene Hefe. Am 21. V. wurde ein totes Junges gefunden. Es wurden deshalb 2 Mäuse fortgenommen und der Versuch mit 2 Mäusen, einem Männchen und einem Weibchen, fortgesetzt und das Futter vom 3. VI. ab wieder gebacken. Am 20. VI. wurden 5 Junge geworfen, die mit den Alten zusammen aufgezogen wurden. Nach 8 Tagen wogen sie zusammen 15 g (II a). Sie gediehen gut und wurden geschlechtsreif.

Andere Versuche verliefen ähnlich.

Bei demselben Futter ohne Hefe blieben junge Mäuse klein und entwickelten sich nicht.

Versuch R. III. 15.

1 Weibchen und 3 Männchen wogen am 25. VI. 1906 39 g, am 10. V. 63 g, am 21. V. bis 1. VI. 62 g. Die Maus wurde nicht trächtig.

Versuch R. III. 16.

2 alte Mäuse hielten sich vom 3. bis 16. VI. auf einem Gewicht von 35 g. 10 junge wiegen am 3. VI. 35 g, 7. VI. 40 g, am 16. VI. 39 g.

Der Zusatz von Gelbei brachte in das Futter ein Naturprodukt. Um dieses zu denaturieren, wurde für die folgenden Versuche die entsprechende Menge Gelbei mit Alkohol extrahiert. Dann wurde das „Vitellin" und der Alkoholrückstand, das Eifett, zur Herstellung des Futters benutzt. Dieses enthielt jetzt: 14 g Casein, 4 g Hühnereiweiß, 7,2 g Vitellin, 60 g Kartoffelstärke, 120 g Weizenstärke, 10 g Traubenzucker, 13 g Margarine, 14,5 g Eifett, 4 g Salze.

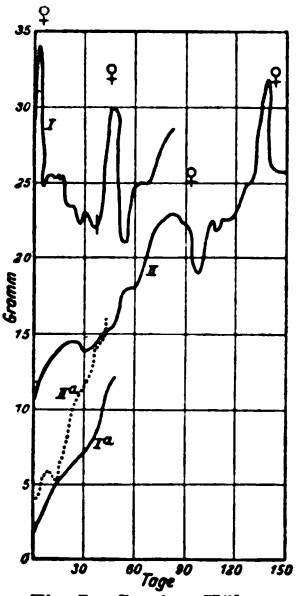


Fig. 7. Casein—Hühnereiweiß—Vitellin—Eifett.

Auch dieses Futter erwies sich als geeignet zum Aufziehen von jungen Mäusen.

In Versuch R. III 18a erhielten 2 alte und 2 junge Mäuse (I u. II) obiges Futter vom 13. VI. bis 8. VII. 1906 ungebacken. Eine alte Maus warf am 17. VI. 6 Junge; am 21. VI. waren 5 davon aufgefressen. Das übrig gebliebene entwickelt sich nicht und starb am 22. VII.

Vom 8. VII. ab wurde das Futter gebacken. Vom 22. VII. befand sich die eine ältere Maus mit den zwei Jungen in demselben Käfig und warf am 7. VIII. 5 Junge (Ia). Die beiden jüngeren Mäuse wurden von den anderen getrennt (II). Beide wurden geschlechtsreif. Die eine Maus warf am 21. IX., also nach etwa 100 Tagen künstlicher Fütterung. Die 2 geworfenen Jungen entwickelten sich gut (IIa).

Das Lecithin, das in dem Gelbei und im Eifett enthalten war, ist zum Aufziehen der Jungen nicht notwendig. Es gelang dies auch mit einem Gemisch aus 14 g Casein, 4 g Hühnereiweiß, 7,2 g Vitellin, 60 g Kartoffelstärke, 120 g Weizenstärke, 27 g Margarine, 4 g Salze.

Dieses Gemisch wurde in dem folgenden Versuche zuerst noch wie in dem vorhergehenden mit Hefe gebacken.

Als sich nun während dieses und eines anderen Versuches zeigte, daß das Lecithin entbehrlich war, wurde auch die Hefe ausgeschaltet. Ihre diastatische Wirkung wurde da-

durch ersetzt, daß die Hälfte der Kartoffelstärke mit Wasser verkleistert und mit Speichel verzuckert wurde. Die diastasierte Flüssigkeit wurde zum Sirup eingedampft. In diesen wurden die übrigen Bestandteile des Futters hineingerührt.

Den Teig so zu verwenden, wäre nicht zweckmäßig gewesen, da er, wenn feucht, nicht haltbar, und nur getrocknet, vielleicht zu hart gewesen wäre. Er wurde deshalb nach Zusatz von Ammoniumbicarbonat auf 125° erhitzt, wobei ein lockeres Gebäck mit brauner Kruste entstand.

Versuch R. III. 17.

Eine alte Maus (I) erhält das mit Hefe gebackene, lecithinfreie Futter vom 25. VI. bis 18. VI. 1906. Vom 19. X. ab war die Hälfte der Kartoffelstärke diastasiert. Diese Maus warf am 26. VI. 5 Junge. Sie warf später noch einmal am 29. IX. Diesmal wurden die Jungen gefressen. Am 12. XI. warf sie noch einmal, starb aber sofort darauf.

Mit dieser Maus zusammen befanden sich 2 junge Mäuse (II), die dasselbe Futter vom 13. VI. an erhielten. Sie wuchsen und wurden geschlechtsreif, blieben aber zunächst noch etwas kleiner als normale Mäuse. Von diesen warf eine Maus am 15. X. Die Jungen wurden aber bis auf eins gefressen, das tot im Käfig lag.

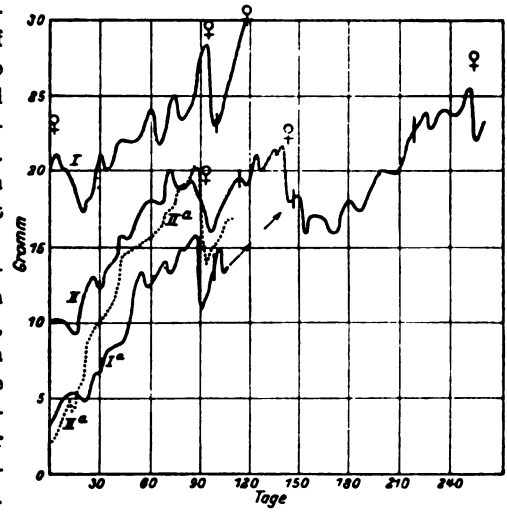


Fig. 8. Casein—Hühnereiweiß—Vitellin.

Von den 5 jungen Mäusen (Ia), die am 26. VI. geworfen worden waren, starb eins am 21. VII. Die anderen entwickelten sich gut und wurden geschlechtsreif. Auch sie erhielten vom 19. X. das teilweise diastasierte mit Hefe gebackene Futter.

Am 1. XI. wurden die Mäuse Ia und II vereinigt. Eine von diesen warf am 16. XI. Von diesem Wurf blieben 3 Junge am Leben (IIa).

Vom 14. I. 1907 ab wurde mit Ammoniumbicarbonat gebacken. Die älteren Mäuse hielten sich auf ihrem Gewicht. Sie warfen, die Würfe wurden gefressen. Die jungen Mäuse (IIa) wuchsen bis zum 14. II. 1907 von 10,5 auf 20 g.

Anstatt mit Speichel wurde die Stärke in späteren Versuchen mit käuflicher Diastase (E. Merck) saccharifiziert.

Es erwies sich auch zweckmäßig, zum Backen nicht Ammoniumbicarbonat zu nehmen. Vom Ammoniak können kleine Mengen im Gebäck zurückbleiben und jungen Mäusen verderblich werden. Wir ersetzten es durch ein „Backpulver" aus 22 g saurem weinsaurem Kalium und 8,4 g Natriumbicarbonat.

So wurde ein für die Ernährung und Aufzucht von Mäusen geeignetes Futter in folgender Weise erhalten: 20 g Kartoffelstärke werden mit Wasser verkleistert. Man läßt auf etwa 30 bis 40° abkühlen, setzt 10 bis 20 ccm Speichel bzw. eine Lösung von 0,2 g Diastase (E. Merck) hinzu und läßt es in der Wärme stehen, bis sich eine Probe der Flüssigkeit mit Jod nur gelb färbt. Dann dampft man auf dem Wasserbade zum Sirup ein. Nun schmilzt man in einer Porzellanschale 27 g Margarine und rührt in diese 40 g Kartoffelstärke, 120 g Weizenstärke, 10 g Traubenzucker, 14 g Casein, 7,2 g Vitellin, 4 g Hühnereiweiß und 4 g Salze (s. o.). Dieses Pulver trägt man in den durch Verzuckerung der Stärke erhaltenen Sirup ein. Zum Schluß vermischt man mit Ammoniumbicarbonat, besser mit 5 g „Backpulver" und erhitzt etwa $1^1/_2$ Stunde auf 120°. Besonders wenn es sich um die Aufzucht junger Tiere handelt, darf das Gebäck nicht zu scharf gebacken sein.

Als ein beiläufiges, aber nicht unwesentliches Ergebnis dieser Versuchsreihe betrachte ich, daß sie die Bedeutung zeigt die das Backen des Mehles mit Hefe für die Ernährung besitzt, und beweist, daß Lecithin für die Ernährung nicht notwendig ist.

Reihe IV.

Wir kehren nunmehr wieder zu der Frage zurück: Haben die verschiedenen Eiweißstoffe für die Ernährung die gleiche Bedeutung? Wir standen unter der vorgefaßten Meinung, daß für die Ernährung ein Gemenge der verschiedenen Eiweißstoffe, besonders von phosphorhaltigen und phosphorfreien Eiweißstoffen erforderlich sei und wurden in dieser Annahme bestärkt durch zwei Versuchsreihen: In der einen erhielten je zwei ausgewachsene Mäuse in ihrem Futter nur Hühnereiweiß,

in der anderen nur Vitellin. In beiden Versuchen trat nach einiger Zeit fortschreitende Gewichtsabnahme ein (siehe auch Reihe I, Versuch 22).

Versuch R. III. 28.

25,2 g Hühnereiweiß. 2 Mäuse Gewicht am 26. XI. 1907 47 g, am 25. VII. 19 g.

Versuch R. III. 29.

25,2 g Vitellin. 2 Mäuse Gewicht am 26. VI. 1907 45 g, am 25. VII. 15 g.

Auch in Versuchen mit Edestin allein wuchsen junge Mäuse nicht.

Es wurden deshalb in den folgenden Versuchen Gemische gefüttert, die jedesmal zwei der folgenden Eiweißstoffe enthielten: Hühnereiweiß, Edestin, Aleuronat (Hundhausen), Casein, Vitellin.

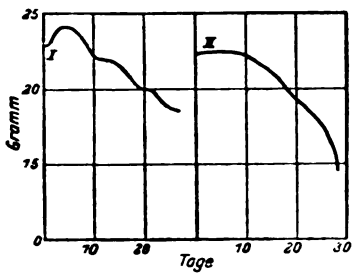


Fig. 9.
I Hühnereiweiß. II Vitellin.

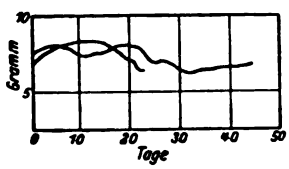


Fig. 10. Edestin.

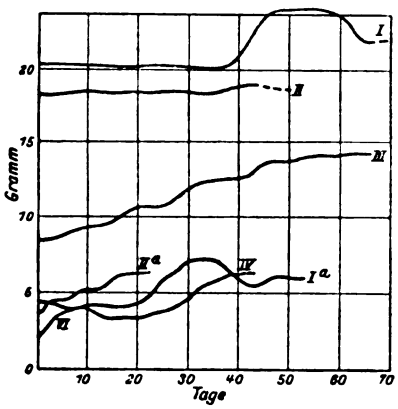


Fig. 11. Vitellin—Hühnereiweiß.

Ein Gemisch von Vitellin und Hühnereiweiß genügte, um ausgewachsene Mäuse auf ihrem Gewicht zu erhalten. Noch nicht völlig ausgewachsene Mäuse wuchsen sehr langsam. Ganz junge Mäuse kamen in Wachstumsstillstand und gingen ein.

Versuch R. III. 23 und 25.

7,2 g Vitellin, 18 g Hühnereiweiß. Die alte Maus (I) vom 27. IV. bis 31. VII. 1905 völlig normal. Die von ihr am 5. V. geworfenen 4 Jungen (Ia) wogen am 27. V. zusammen 17 g, wachsen aber dann

nicht wie oben. Am 2. VI. ist eines der Jungen aufgefressen[1]), am 2. VII. ist ein zweites tot, am 5. VII. ein drittes, am 14. VII. das vierte. Auch eine andere alte Maus (II) erhält sich normal. Von den 4 Jungen (IIa), die am 23. VI. zusammen 15 g wogen, stirbt eins am 2. VII., das zweite am 5. VII., das dritte am 15. VII., das vierte am 17. VII.

Versuch R. IV. 3b.

4 junge Mäuse (III) erhalten das Futter vom 25. V. bis 27. VII. Eine Maus stirbt am 10. VI. Die anderen bleiben klein, sehen gut aus, dicht behaart.

Versuch R. VI.

Eine alte Maus wirft am 1. X. 1909 4 Junge (IV). Die Alte hält sich vom 1. X. bis 19. XI. 1909 normal. Die Jungen wiegen am 6. X. 10 g. Am 21. X. ist ein Junges aufgefressen, am 4. XI. ein zweites. Die Jungen wachsen nicht und sehen nicht gut aus.

Ein Gemisch, das 18 g Edestin und 7,2 g Vitellin enthielt, war zum Aufziehen junger Mäuse nicht geeignet.

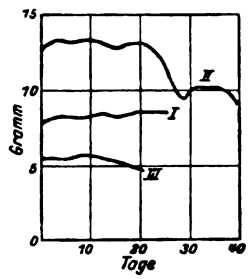


Fig. 12. Vitellin—Edestin.

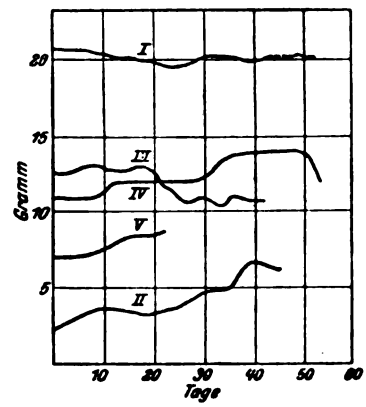


Fig. 13. Vitellin—Aleuronat.

Versuch R. IV. 4.

3 Mäuse (I) halten sich vom 3. bis 27. VII. 1908 auf ihrem Gewicht. 3 Mäuse desselben Wurfes wogen bei Ernährung mit Milch und Semmel 36 g gegen 25 g der künstlich ernährten.

Versuch R. V. 1.

3 junge Mäuse (II) vom 10. bis 28. II. 1909 gewichtskonstant 38 bis 39 g, dann ohne ersichtlichen Grund Gewichtsabnahme und weiter vom 9. bis 24. III. gewichtskonstant.

---

[1]) Da die Kurven das Durchschnittsgewicht angeben, kann beim Tode einer Maus mit verhältnismäßig geringem Gewicht ein Ansteigen der Kurve eintreten.

Versuch R. V. 6.

5 junge Mäuse (III) vom 4. bis 17. VI. 1909 29 bis 30 g. Dann Abnahme. Eine Maus am 18., eine andere am 26. VI. tot.

Mit einem Gemisch von 1 8 g Aleuronat und 7,2 g Vitellin hielten sich ältere Mäuse mehr oder weniger gut auf ihrem Körpergewicht, jüngere wuchsen eine Zeitlang, blieben aber dann stehen.

Versuch R. VI. 4.

Eine alte Maus vom 1. X. bis 19. XI. 1909 24 bis 21 g. Von ihr waren am 30. IX. 4 Junge (II) geworfen worden, die am 6. X. 9 g, am 7. XI. 20 g, am 19. XI. 19 g wogen.

Versuch R. V. 3.

3 junge Mäuse (III) vom 10. II. bis 18. III. 1909. Das Gewicht sinkt von 38 g auf 32 g.

Versuch R. IV. 2a.

Eine Alte (I) vom 19. V. bis 21. VII. 1909 gewichtskonstant. Ein Junges (IV) am 19. V. 11 g, am 30. V. 12 g, 23. VI. 14 g, am 17. VII. 14 g, am 21. VII. 12 g.

Versuch R. IV. 2c.

3 junge Mäuse (V) vom 2. bis 27. VII. 1908. 21 bis 26 g.

Auch mit einem Gemisch von 18 g Casein und 7,2 g Vitellin hielten sich alte Mäuse gut. Junge Mäuse wuchsen nicht.

Versuch R. III. 24.

2 junge Mäuse (I) vom 27. IV. bis 2. VI. 1906 19 bis 21 g, erhalten am 2. VI. Milch und Semmel; sofort Wachstum. Eine alte Maus warf am 5. V. 5 Junge. Von diesen sind am 27. V. 2 aufgefressen. Die 3 übrig gebliebenen wiegen zusammen 12 g, sie sehen schlecht aus und sind am 2. VI. aufgefressen.

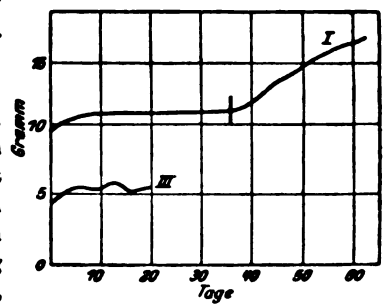


Fig. 14. Casein—Vitellin.

Versuch R. III. 27.

23. VI. 1906 eine Alte und 3 Junge (II), am 28. VI. ein Junges gefressen, am 5. VII. das zweite, am 14. VII. das dritte. Letzteres wog am 11. VII. 5 g. Die Alte wog am 23. VI. 21 g, am 2. bis 8. VII. 24 g, am 20. VII. 22 g.

Mit einem Gemisch von Casein und Hühnereiweiß wuchsen junge Mäuse zu Anfang, dann trat Gewichtsstillstand ein.

Versuch R. III. 21.

9. III. 1906. 2 alte und 2 junge Mäuse. Das Gewicht der Alten beträgt am 9. III. 41 g, am 24. III. 42 g, am 3. IV. 40 g. Am 2. IV. wird das eine, am 3. IV. das andere Junge aufgefressen.

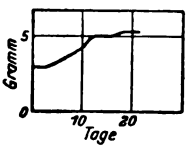


Fig. 15. Casein—Hühnereiweiß.

Aus diesen Versuchen wurde der Schluß gezogen, daß eine Nahrung, die zur dauernden Erhaltung von Mäusen und im besonderen zur Aufzucht junger Mäuse geeignet sein soll, ein Gemenge der verschiedenen Eiweißstoffe, phosphorhaltiger und phosphorfreier, enthalten muß[1]). Denn eine Nahrung, die nur Vitellin oder Hühnereiweiß oder eines der angeführten Gemische von zwei Eiweißstoffen enthielt, genügte nicht, mindestens nicht zur Aufzucht junger Tiere. Gegen die Beweiskraft dieses Schlusses stiegen aber bald Bedenken auf. Es war immerhin noch möglich, daß der ungünstige Ausfall der angeführten Versuche darauf beruhte, daß das Mischungsverhältnis der Nahrungsstoffe doch nicht das richtige war, daß die Herstellungsweise des Futters, besonders das Aufschließen der Stärke und das Backen noch Verbesserungen erforderte. Kommt es doch sehr viel darauf an, daß die Tiere, und besonders die wachsenden, an jedem Tage ein Mindestmaß von allen zur Ernährung notwendigen Stoffen auch wirklich in ihren Stoffwechsel überführen können. Auch war immerhin nicht ganz sicher, ob nicht doch eine gewisse Menge von Lecithin- und Nucleinsäuren in der Nahrung enthalten sein, ob das Eisen in einer bestimmten Form zugeführt werden muß u. a. m. Es wurden deshalb nach einer durch äußere Umstände bedingten Unterbrechung die Versuche von neuem wieder aufgenommen.

Reihe V.

Die Futtergemische wurden in der früher beschriebenen Weise hergestellt. Die entsprechende Menge Stärke wurde zuerst mit Speichel, später mit Diastase saccharifiziert. Das Backen geschah unter Anwendung des Gemisches von saurem weinsaurem Kalium und Natriumbicarbonat.

[1]) Allgem. Med. Zentral-Zeitung 1908, Nr. 9.

Als Eiweißstoffe wurden benutzt Hühnereiweiß, Casein und Edestin.

Das Eisen wurde zugeführt in Versuch 1 als nucleinsaures Eisen in den übrigen Versuchen als „Hühnereiweißeisen". Ersteres wurde erhalten, indem eine Lösung von nucleinsaurem Natrium (Böhringer Söhne in Mannheim) mit Eisenchlorid gefällt und der Niederschlag mit Alkohol und Äther zur Trockne gebracht wurde, letzteres durch Fällen einer Lösung von Hühnereiweiß mit Eisenchlorid, Waschen des abfiltrierten Niederschlags mit Wasser und Behandeln mit Alkohol und Äther.

Mit einem Gemisch, das Casein, Hühnereiweiß und Hühnereiweißeisen enthielt, gelang es, junge Mäuse aufzuziehen. Ein Wurf, der von künstlich ernährten Eltern stammte, wurde geschlechtsreif und erzeugte lebensfähige Junge. Diese Jungen sahen sehr gut aus. Als sie schon Zähne hatten und zeitweilg fraßen, machten sie noch Versuche bei der Alten zu saugen. Sie wurden aber von dieser abgewehrt und gingen nach einiger Zeit ein.

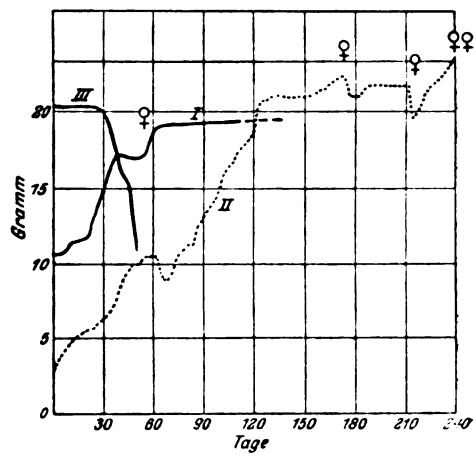


Fig. 16. Casein—Hühnereiweiß.

Versuch R. III. 3.

4 junge Mäuse (I) erhielten vom 22. V. 1911 ab ein Gemisch von 10 g Casein, 5 g Hühnereiweiß, 2 g Hühnereiweißeisen, 20 g Kartoffelstärke diastasiert, 25 g Kartoffelstärke roh, 90 g Weizenstärke, 5 g Traubenzucker, 10 g Margarine, 3 g Salze, 5 g „Backpulver".

Die Mäuse wogen am 22. V. 43 g und am 15. VI. erst 47 g. Als jetzt das Futter „weicher gebacken" wird, steigt das Gewicht bis zum 2. VII. schnell auf 69 g. Am 18. VII. wirft eine Maus. Die drei anderen Mäuse bleiben bis zum 6. IX. auf einem Gewicht von 56 bis 58 g; sie werfen nicht.

Der Wurf vom 18. VII. besteht aus 4 Jungen (II). Sie wiegen am 15. VIII. 11 g, am 3. IX. 22 g, am 26. IX. 33 g, am 27. X. 44 g. Eine junge Maus geht infolge eines Unfalls zugrunde. Die drei anderen wiegen

am 9. XI. 32 g, und zwar die eine 6, die andere 12, die dritte 14 g. Die Jungen desselben Wurfes haben sich also bei derselben Ernährung ganz ungleichmäßig entwickelt, eine Beobachtung, die wiederholt auch bei anderen Versuchen gemacht wurde. Am 11. XII. wogen die jungen Mäuse 44 g, und zwar einzeln 10, 16 und 18 g, am 2. I. 1912 55 g, am 3. II. 66 g.

Am 4. II. 1913, d. h. am 199. Lebenstage, wirft eine dieser Mäuse. Die 4 Jungen sehen gut aus, sind aber am 22. II. noch unbehaart, tot. Am 9. III. wirft eine zweite, am 13. III. eine dritte Maus. Von ersterer ward nur ein Junges, von der anderen wurden 4 Junge gefunden. Diese 5 Mäuse sahen zunächst sehr gut aus. Sie wogen am 31. III. zusammen 29 g (jede ca. 6 g), am 2. IV. war eine tot, die übrigen wogen 25 g, am 6. IV. 27 g, am 7. IV. sind zwei weitere tot, die übriggebliebenen zwei wogen 18 g, am 8. IV. lebte nur noch eine Maus, 7 g, am 9. IV. war auch die letzte tot. Die 3 Mäuse (II) halten sich auf ihrem Gewicht und wiegen am 19. IV. 65 g.

Es wurden nun dem Futtergemisch 0,1 g nucleinsaures Natrium und später noch 7 g Eifett hinzugesetzt, um zu sehen, ob man mit diesem Futter die zweite Generation aufziehen könnte. Es gelang dies jedoch nicht.

Die 3 Mäuse (II) wogen am 19. IV. 65 g, am 29. IV. 70 g. Am 30. IV. warf eine der Mäuse. Das Gewicht der 5 jungen Mäuse betrug am 2. VI. 21 g, am 20. VI. 25 g. Dem Futter wurden jetzt noch 7 g Eifett hinzugesetzt. Ein Wachstum fand nicht statt, die Jungen wogen am 30. VI. 24 g. Als vorübergehend die Kartoffelstärke durch Reisstärke ersetzt wurde, gingen drei der Jungen zugrunde und auch die Alten sahen schlechter aus. Vom 9. VII. ab wurde Futter mit Eifett gefüttert. Die zwei noch vorhandenen Jungen wogen am 12. VII. 7 g, am 22. VII. 8 g, am 20. VII. starb eine Maus, die übriggebliebene wog 4 g, am 3. VIII. wog sie noch immer 4 g. Sie wurde zu Milch und Semmel gesetzt. Sie nahm aber auch jetzt nicht an Gewicht zu und starb am 15. VIII. Es war also ein ganz außerordentlich langer Wachstumsstillstand von 71 Tagen beobachtet worden, nach welchem normale Ernährung das Wachstum nicht mehr zu beeinflussen schien.

Die Alten (II) waren von normalen, gut genährten Mäusen nicht zu unterscheiden, hatten aber innerhalb der letzten $3^1/_2$ Monate nicht mehr geworfen.

Eiweiß war in dem Futtergemisch in mehr als ausreichender Menge vorhanden. Die Menge des Hühnereiweißes konnte auf die Hälfte vermindert werden, ohne daß sich das Gewicht der Mäuse veränderte, bei einer Verminderung auf ein Viertel nahm es sehr bald ab.

Versuch R. VII. 6.

3 alte Mäuse (III) erhielten das Futtergemisch des vorhergehenden Versuches, nur statt 5 g 2,5 g Hühnereiweiß. Gewicht der Mäuse vom

9. bis 27. XI. 1911 60 bis 61 g. Am 1. XII. enthielt das Futter 1,25 g Hühnereiweiß. Gewicht am 11. XII. 60 g, am 21. XII. 50 g, am 28. XII. 47 g, sie sitzen zusammengekauert, haben struppiges Fell, fressen vom Futter wenig. Am 29. XII. sind 2 Mäuse tot, Gewicht der dritten 14 g, am 3. I. 1912 11 g. Am 4. I. tot.

Ein Ersatz der Weizenstärke durch rohe Kartoffel- oder Reisstärke wirkte sehr ungünstig.

Die Margarine konnte durch Eifett ersetzt werden. Junge Mäuse ließen sich gut aufziehen. Ältere Mäuse, die, künstlich ernährt, nicht geworfen hatten, warfen bei weiterer Fütterung mit lecithinhaltigem Futter wieder.

Versuch R. VII. 10a.

3 Mäuse, die im Versuch 5 (s. u.) bereits 206 Tage künstlich ernährt worden waren, erhielten vom 20. IV. 1912 an das Futter von Versuch von R. VII. 3 (s. o.), in dem statt Margarine Eifett war. Gewicht am 20. IV. 70 g, am 12. VI. 70 g, am 17. VI. 75 g, am 20. VI. hatte eine Maus geworfen. Gewicht der drei jungen Mäuse

am	9. VII.	12. VII.	18. VII.	21. VII.	24. VII.	27. VII.	30. VII.
g	9	10	11	12	13	14	15

am	3. VIII.	8. VIII.	12. VIII.	16. VIII.	21. VIII.	24. VIII.
g	15	17	18	18	20	22

Die kleinen Mäuse sahen gut aus. Der Versuch mußte aus äußeren Gründen abgebrochen werden.

In den folgenden Versuchen enthielt das Futter 10 g Casein, 10 g Hühnereiweiß, 2 g Hühnereiweißeisen, 20 g Kartoffelstärke diastasiert, 25 g Kartoffelstärke roh, 90 g Weizenstärke, 10 g Traubenzucker, 10 g Milchzucker, 10 g Margarine, 7 g Eifett, 6 g Salze, 5 g Backpulver. Junge Mäuse ließen sich bis zur Geschlechtsreife aufziehen. Auf die Fruchtbarkeit hatte der Lecithingehalt der Nahrung diesmal keinen Einfluß. Eine weitere Erhöhung des Fett- und Lecithingehaltes und gleichzeitiger Verzicht auf die diastasierte Stärke hatte für ältere Mäuse keine Bedeutung, war aber für die Aufzucht der zweiten Generation anscheinend unzweckmäßig. Der Wurf entwickelte sich anfangs gut, später trat Gewichtsstillstand und Tod ein.

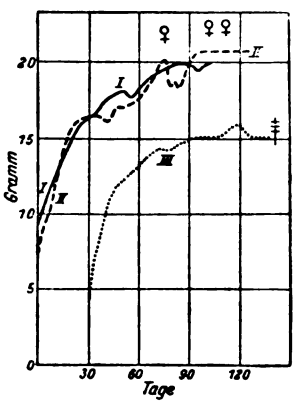


Fig. 17. Casein—Hühnereiweiß—Eifett—Milchzucker.

Versuch R. VII. 13.

2 kleine Mäuse (I) wiegen am 27. IX. 1912 18 g, am 10. I. 1913 40 g.

4 kleine Mäuse (II) wiegen am 27. IX. 1912 27 g, am 16. X. 55 g, am 10. XI. 65 g, am 16. XII. 75 g. Am 26. XII. hat eine Maus geworfen. Im Käfig findet sich aber nur 1 Junges tot. Zum Futter werden noch 2 g milchsaurer Kalk gegeben.

Am 8. II. neuer Wurf. 4 Junge tot. Am 21. III. Wurf, 5 Junge tot. 30. IV. Wurf, 3 Junge tot.

Vom 1. V. erhalten die Mäuse im Futter die doppelte Menge Fett und Lecithin, dafür aber keine diastasierte Kartoffelstärke.

Die 4 älteren Mäuse (II) wiegen am 15. VI. 75 g, am 28. VI. 80 g, am 27. VII. 85 g und halten sich auf diesem Gewicht bis zum 20. X., werfen aber nicht mehr.

Der Wurf vom 30. IV. (Kurve III) wiegt am 16. VI. 14 g, am 4. VII. 29 g, am 2. VIII. 41 g, am 30. VIII. 43 g, am 15. IX. 45 g, am 29. IX. 45 g; am 30. IX. stirbt 1 Maus, die beiden anderen wiegen 32 g; am 8. X. stirbt eine zweite; die dritte wiegt 14 g und stirbt mit diesem Gewicht am 21. X. 1912.

Die Einfügung von Lecithin in die Nahrung und die Vermehrung des Fettes hatte auch in den folgenden Versuchen keinen günstigen, sondern eher einen ungünstigen Einfluß. Junge Mäuse wuchsen anfangs gut, gingen aber später bis auf eine ein.

Versuch R. VII. 16.

1. 3 kleine Mäuse (I) erhalten vom 28. IV. bis 27. V. 1912 das lecithin- und fettreiche Futter des Versuchs R. VII. 13. Ihr Gewicht nimmt von 13 g auf 32 g zu. Dann wird das Eifett durch Margarine ersetzt. Die Mäuse wachsen weiter. Sie wiegen am 4. VII. 42 g, am 6. VIII. 52 g. Am 7. VIII. stirbt eine Maus. Die beiden anderen wiegen 36 g und am 30. VIII. 35 g, also Gewichtsstillstand. Am 2. IX. stirbt die zweite Maus. Die dritte hält sich bis zum 20. X. auf einem Gewicht von 20 bis 21 g, hat sich also bei dem fettreichen Futter bis zum normalen Gewicht entwickelt.

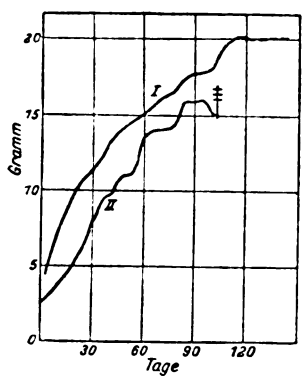


Fig. 18. Casein—Hühnereiweiß—Milchzucker.

2. 3 kleine Mäuse wiegen am 28. IV. 14 g, am 10. bis 15. VI. 38 g.

3. 3 ältere Mäuse wiegen vom 16. VI. bis 10. IX. 60 bis 70 g. Eine wirft am 16. VI. 3 Junge, Wurf am 14. IX. 2 Junge, am 1. X. 2 Junge.

4. Der Wurf vom 16. VI. 1913, 3 Junge (II), wiegt am 4. VII. 8 g, am 6. VII. 25 g; am 9. VIII. ist 1 Maus tot, die beiden anderen wiegen

19 g, am 14. VIII. 20 g, am 1. IX. 24 g. Am 3. IX. ist eine weitere Maus tot, die letzte wiegt 14 g, am 24. IX. bis 15. X. 15 bis 16 g, tot.

Änderungen innerhalb der stickstofffreien Bestandteile hatten also zu keiner wesentlichen Verbesserung des Futtergemisches geführt. Auch ein Ersatz des Hühnereiweißeisens durch nucleinsaures Eisen schien keinen Vorteil zu bieten.

Versuch R. VII. 1.

Die Nahrung enthielt: 10 g Casein, 5 g Hühnereiweiß, 2 g nucleinsaures Eisen, 20 g Kartoffelstärke mit 10 bis 15 ccm Speichel diastasiert, 25 g Kartoffelstärke roh, 90 g Weizenstärke, 10 g Margarine, 5 g Traubenzucker, 3 g Salze.

4 junge Mäuse wiegen am 11. V. 1911 41 g und bleiben bis zum 15. VI. auf diesem Gewicht annähernd stehen. Als jetzt dasselbe Futter

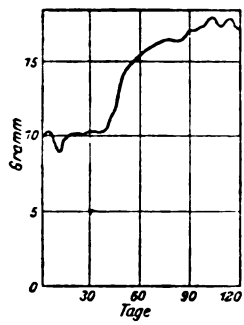


Fig. 19. Casein—Hühnereiweiß—nucleinsaures Eisen.

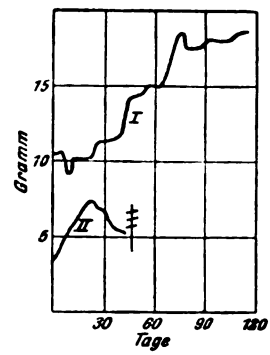


Fig. 20. Casein—Hühnereiweiß—nucleinsaures Natrium.

„weicher gebacken" wird, steigt das Gewicht. Es beträgt am 18. VI. 45 g, am 23. VI. 56 g, am 26. VI. 60 g, am 6. VII. 64 g, am 18. VII. 66 g, am 3. VIII. 69 g, am 15. VIII. 71 g, am 6. IX. 72 g.

Die jungen Mäuse wuchsen, blieben aber etwas kleiner als normale.

Beim Ersatz des nucleinsauren Eisens durch nucleinsaures Natrium wuchsen 10 g schwere Mäuse noch bis auf 18,5 g, befanden sich anscheinend ganz wohl, hatten aber ein struppigeres Fell als die Mäuse mit nucleinsaurem Eisen und Hühnereiweißeisen. Noch jüngere Mäuse gingen bald zugrunde.

Versuch R. VII. 2.

4 junge Mäuse (I) wiegen am 11. V. 1911 42 g. Sie erhalten dasselbe Futter wie die Mäuse im vorhergehenden Versuche, nur enthält dieses statt 2 g nucleinsauren Eisens 2 g nucleinsaures Natrium (Böh-

ringer Söhne). Am 20. V. sind 2 Mäuse gestorben. Die beiden anderen wiegen am 22. V. 21 g und am 11. VI. noch 23 g, also wie im vorhergehenden Versuche Wachstumsstillstand.

Auch hier tritt Wachstum ein, als dasselbe Futter weicher gebacken wird. Die Mäuse wiegen am 23. VI. 28 g, am 2. VII. 29 g, am 6. bis 14. VII. 30 g, am 18. VII. 35 g, von da ab hält sich das Gewicht bis zum 6. IX. auf 36 bis 37 g. — Dasselbe Futter erhält eine Alte mit ihren 4 Jungen. Diese wiegen am 23. VI. 14 g, am 20. VI. 18 g, am 2. VII. 21 g, am 6. VII. 25 g, am 10. VII. 27 g, am 14. VII. 30 g, am 18. VII. 27 g, am 21. VII. 28 g, am 26. VII. 27 g. Eine Maus wird von der alten aufgefressen. Die 3 Mäuse wiegen am 27. VII. 18 g, am 30. VII. 16 g, am 31. VII. 14 g; die kleinen Mäuse sind tot, die Alte ist anscheinend vollkommen wohl. Alle jungen Mäuse zeigten schon von Anfang an ein schwächliches Aussehen, das allmählich zunahm. Die Jungen konnten in einem Alter von 6 Wochen noch nicht ordentlich laufen.

Eine Alte mit einem Jungen bei demselben Futter. Das Junge wiegt am 18. VIII. 4 g, am 28. VIII. 5 g, am 27. VIII. bis 6. IX. 6 g, tot. Ebenfalls elendes Aussehen.

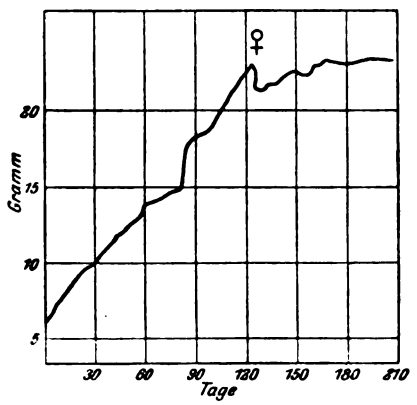


Fig. 21. Hühnereiweiß.

In all den bisher mitgeteilten Versuchen dieser Reihe enthielt das Futtergemisch stets Casein und Hühnereiweiß, also ein Gemisch von phosphorhaltigen und phosphorfreien Eiweißstoffen. Nunmehr seien aber die Versuche mitgeteilt, die zeigen, daß man Mäuse auch mit einem Futter aufziehen und auf die Dauer erhalten kann, in dem phosphorhaltige Eiweißstoffe vollkommen fehlen.

Versuch R. VII. 5.

5 junge Mäuse erhalten ein Futter aus 5 g Hühnereiweiß, 2 g Hühnereiweißeisen, 20 g Kartoffelstärke diastasiert, 25 g Kartoffelstärke roh, 90 g Weizenstärke, 10 g Margarine, 5 g Traubenzucker, 3 g Salze, 5 g Backpulver. Das Futter ist also eiweißärmer als in den anderen Versuchen. Es enthält nur 4,4% Eiweiß.

Die 5 Mäuse wiegen am

29. IX. 1911	10. X.	27. X.	9. XI.[1])	16. XI.	27. XI.	14. XII.	19. XII.
30 g	41 g	50 g	59 g	63 g	70 g	74 g	74 g

[1]) Gewicht der einzelnen Mäuse: 8, 11, 13, 13, 14 g.

Am 19. XII. stirbt die kleinste Maus.

4 Mäuse wiegen am			3 Mäuse wiegen am			
21. XII. 1911	9. I. 1912	26. I.[1])	30. I.	17. II.	17. III.	20. IV.[2])
70 g	79 g	92 g	64 g	67 g	70 g	70 g

Versuch R. VII. 11.

Das Futter enthält nicht 5 g, sondern 10 g Hühnereiweiß, statt 10 g Traubenzucker 10 g Milchzucker, statt 3 g Salze 6 g Salze, die übrigen Bestandteile wie im vorhergehenden Versuche.

3 kleine Mäuse wiegen:

14. IX. 1911	2. X.
30 g	39 g

Am 6. X. ist 1 Maus tot, die 2 anderen Mäuse wiegen am

8. XI. 1911	16. X.	8. XII.	5. I. 1912	27. I.	16. II.
30 g	34 g	36 g	37 g	38 g	39 g

Ein Zusatz von Eifett und eine Vermehrung des Fettgehaltes war auch hier ohne erkennbaren Einfluß.

Versuch R. VII. 14. 1.

Das Futter enthält: 10 g Hühnereiweiß, 2 g Hühnereiweißeisen, 20 g Kartoffelstärke diastasiert, 25 g Kartoffelstärke roh, 90 g Weizenstärke, 10 g Traubenzucker, 10 g Milchzucker, 10 g Margarine, 7 g Eifett, 6 g Salze.

3 kleine Mäuse (I), am 12. XI. 1912 geboren, wiegen am 8. XII. 14 g. Am 9. XII. stirbt 1, die beiden anderen wiegen:

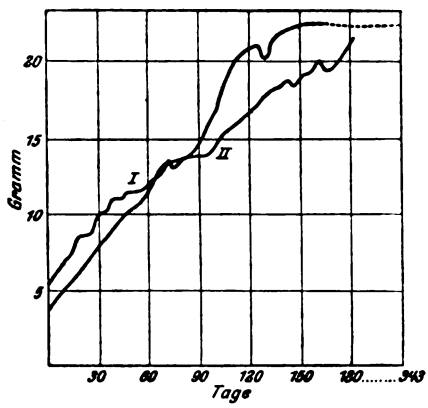


Fig. 22. Hühnereiweiß—Eifett.

12. XII. 1912	20. XII.	29. XII.	10. I. 1913	27. I.	16. II.
12 g	13 g	16 g	18 g	22 g	24 g
28. II.	16. III.	20. III.	10. IV.	25. IV.	6. V.
26 g	28 g	30 g	40 g	42 g	41 g
10. V.	16. V.	15. VI.	25. VII.	20. IX.	20. X.
43 g	45 g	47 g	44 g	43 g	44 g

[1]) Am 27. I. wirft eine Maus 5 Junge. Diese entwickelten sich gut, konnten laufen, gingen aber wie die in R. VII. 3 ohne erkennbaren Grund am 17. II. ein.

[2]) Die Mäuse dienen zu Versuch R. VII. 10a (s. o.).

3 kleine Mäuse (II) wiegen:

20. III. 1912	25. III.	10. IV.	25. IV.	6. V.	9. V.	16. V.
12 g	14 g	20 g	25 g	27 g	31 g	35 g
4. VI.	10. VI.	22. VI.	20. VII.	25. VII.	6. VIII.	24. VIII.
40 g	41 g	42 g	49 g	52 g	55 g	57 g

1 Maus tot; 2 Mäuse wiegen:

26. VIII.	10. IX.
38 g	39 g

1 weitere Maus tot. Die letzte Maus hält sich auf einem Gewicht von 20 bis 22 g, bis zum 20. X. beobachtet.

Auch mit Edestin und Hühnereiweißeisen ließen sich ausgewachsene Mäuse dauernd erhalten.

Versuch R. VII. 7.

Das Futter enthält 15 g Edestin, 2 g Hühnereiweißeisen, 20 g Kartoffelstärke verzuckert, 25 g Kartoffelstärke roh, 90 g Weizenstärke, 10 g Margarine, 5 g Traubenzucker, 3 g Salze, 5 g Backpulver.

3 Mäuse wiegen vom 10. I. bis 3. III. 1912 62 bis 65 g, vom 11. III. bis 16. IV. 66 bis 69 g.

Durch diese Versuche wird einwandfrei bewiesen, daß phosphorhaltige Eiweißkörper für die Ernährung nicht unbedingt notwendig sind. Da ferner junge Mäuse sich von der Geburt an mit einer Nahrung, die keine phosphorhaltigen Eiweißstoffe enthält, aufziehen lassen, so liegt in den mitgeteilten Versuchen der Beweis, daß die phosphorhaltigen Eiweißstoffe, die sich in den Zellen finden, im tierischen Organismus durch Synthese entstehen. Auf demselben Wege ist bewiesen, daß die Purinkörper, Lecithin u. a. sich im Tierkörper synthetisch bilden.

Durch diese Versuche ist zugleich die Aufgabe gelöst, die sich vor Beginn meiner Versuche schon andere Forscher, von denen besonders C. Bunge zu nennen ist, gestellt, aber vergeblich zu lösen bemüht hatten, nämlich ein Tier dauernd mit einer Nahrung zu erhalten, die nach Willkür aus den einfachen Nahrungsstoffen zusammengesetzt ist.

Von den verschiedenen im Verlaufe der Versuche verwendeten Futtergemischen seien auf der folgenden Tabelle eine Reihe angeführt, mit denen es nicht nur gelang, ausgewachsene Mäuse dauernd zu erhalten, sondern auch junge Mäuse aufzuziehen.

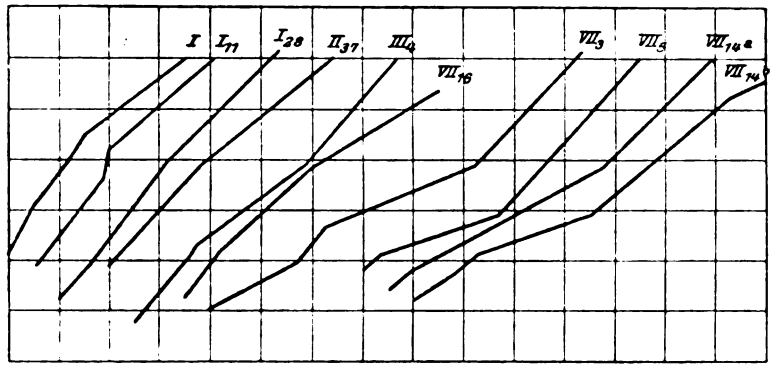


Fig. 23.

Wie das Wachstum erfolgt, ist aus den Kurven zu sehen, in denen jeder Teilstrich der Abszisse der Dauer von 3 Tagen entspricht und die Ordinaten (3 Teilstriche gleich 1 g) die Gewichte angeben.

Futtergemische.

	I_{11}	I_{28}	II_{37}	III_{17}	VII_{16}	VII_{3}	VII_{5}	VII_{14}
Casein	14	14	14	14	10	10	—	—
Vitellin	4	4	—	7,2	—	—	—	—
Hühnereiweiß	4	4	4	4	10	5	5	10
Hühnereiweißeisen	—	—	—	—	2	2	2	2
Kartoffelstärke, roh	60	60	60	60	25	25	25	25
„ diastasiert	—	—	—	—	—	20	20	20
Weizenstärke	120	120	120	120	90	90	90	90
Margarine	13	15	15	27	20	10	10	10
Salze	4	4	4	4	6	3	3	6
Eifett	—	—	Eigelb	—	14	—	—	7
Malz	9	9	—	—	—	—	—	—
Traubenzucker	—	—	—	10	10	5	5	10
Milchzucker	—	—	—	—	10	—	—	10
Eiweiß %	9,6	9,6	—	10,3	11,2	10,0	4,4	6,3
Kohlenhydrate %	82,9	82,0	—	77,2	68,5	82,3	87,5	81,6
Margarine %	5,7	6,5	—	11,0	10,1	6,0	6,2	5,3
Salze %	1,8	1,7	—	1,6	3,0	1,7	1,9	3,2
Eifett %	—	—	—	—	7,1	—	—	3,7
	nicht gebacken			mit Hefe gebacken	mit 5 g „Backpulver" gebacken			

Die Kurve I zeigt das Wachstum von Mäusen, die mit Milch, Semmel und Hafer gefüttert wurden. Die vier nächsten Wachstumskurven laufen dieser fast vollkommen parallel. Die vier letzten zeigen ein ziemlich stark verlangsamtes Wachstum

der jungen Mäuse, für das sich bei einem Vergleich der Futtergemische verschiedene Gründe angeben ließen. Diese Futtergemische sind also für die Aufzucht junger Mäuse den natürlichen noch nicht vollkommen gleichwertig. Auch die anderen sind den natürlichen insofern nicht gleichwertig, als es bisher bei künstlicher Ernährung gelang, nur Enkel aufzuziehen, d. h. Junge, die von Eltern stammten, die bei künstlicher Ernährung gezeugt und aufgewachsen waren. Wurden die Enkel geschlechtsreif, so waren doch ihre Nachkommen nicht lebensfähig. Worauf diese Unvollkommenheit der künstlichen Nahrungsgemische beruht, will ich nicht entscheiden. Überaus bequem ist ja die Erklärung mit Hilfe der Vitamine.

Aber sind denn wirklich schon einwandfreie Beweise für deren Vorhandensein gebracht? Ich bin vorläufig mehr geneigt anzunehmen, daß in der von mir verwendeten künstlichen Nahrung zwar alle für die Ernährung und das Wachstum erforderlichen Stoffe vorhanden waren, aber daß das Mischungsverhältnis oder die Form der Nahrungsstoffe nicht derartig war, um die künstliche Nahrung der natürlichen vollkommen gleichwertig erscheinen zu lassen.

In dieser Meinung werde ich auch bestärkt durch die Betrachtung der Versuche von Th. B. Osborne und L. B. Mendel. Diese begannen ihre Versuche an Ratten ebenso wie ich bei Mäusen mit einer Nahrung, die nur Eiweiß (Casein), Fett, Kohlenhydrate und das von mir angegebene Salzgemisch enthielt. Sie konnten aber erst mit Sicherheit ein Wachstum erzielen, als sie jenes Salzgemisch durch „eiweißfreie Milch“ ersetzten, d. h. durch die Bestandteile der Milch nach Abscheidung von Casein und Milchfett.

Diesen Erfolg beziehen sie auf die Änderung der Salzmischung; wie ich glaube, mit Unrecht. Denn meine Versuche mit Mäusen zeigen, daß das von mir angegebene Salzgemisch für die dauernde Ernährung wachsender Tiere geeignet ist. Mir scheint vielmehr, daß ähnlich wie in meinen Anfangsversuchen die Darreichung der stickstofffreien Stoffe nicht in der geeigneten Form erfolgte. Es ist möglich, daß infolge der Darreichung von wenig Kartoffelstärke bei Gegenwart von verhältnismäßig viel Fett und Zucker nicht genügende Mengen von Stärke diastasiert wurden. Dieser Mangel wurde durch

die eiweißfreie Milch und besonders durch ihren Milchzuckergehalt ausgeglichen. Zu dieser Erklärung stimmt auch der günstige Einfluß des Kotfressens, den Osborne und Mendel beobachteten. Er beruhte wohl kaum in dem Bakteriengehalt der Faeces, sondern vermutlich darin, daß diese ärmer an Fett waren und eine gewisse Menge von Stärke enthielten, die durch die Fermente des Darmes aufgeschlossen war. Auch bei anderen Versuchen scheinen mir die Dinge ähnlich zu liegen. Osborne und Mendel machten den Versuch, die eiweißfreie Milch durch ein in bestimmter Weise zusammengesetztes Gemisch von Salzen und Milchzucker zu ersetzen. Diese Versuche führten zu schwankenden Ergebnissen. In einigen Versuchen gelang die Aufzucht von Ratten mit Casein, Stärke, Fett und „künstlicher, eiweißfreier Milch", in anderen aber nicht[1]). Wenn in letzteren Fällen das Wachstum aufhörte, so begann es wieder, wenn der künstlichen, eiweißfreien Milch ungesalzene Butter zugesetzt wurde. Osborne und Mendel sind geneigt, anzunehmen, daß in der Butter unbekannte, das Wachstum begünstigende Stoffe enthalten sind. Ich glaube, daß auch diese Versuche für einen relativen Mangel an Kohlenhydraten im Stoffwehsel sprechen.

Osborne und Mendel haben und hatten eben bei ihren Versuchen dieselben Schwierigkeiten zu überwinden, wie ich bei den meinigen.

Die zuletzt erwähnten Versuche bezeichnen Osborne und Mendel als „die ersten erfolgreichen Fütterungsversuche, in denen ein andauerndes Wachstum mit sorgfältig gereinigten Nahrungsstoffen und künstlichen Salzmischungen erreicht wurde".

Bei der Wertung dieses Prioritätsanspruches ist zu berücksichtigen, daß es mir, wie aus dem Mitgeteilten (Reihe I) zu ersehen ist, bereits eine Reihe von Jahren vor Osborne und Mendel gelungen war, ältere Mäuse dauernd zu erhalten und junge Mäuse aufzuziehen mit einer Nahrung, die willkürlich aus Eiweiß, Fetten, Kohlenhydraten und Salzen zusammengesetzt waren. Diese Versuche waren Osborne und Mendel, als sie ihre Untersuchungen begannen, mindestens im Prinzip bekannt, ebenso wie die Fragestellung, durch die auf dem von mir gezeigten

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 15, 311, 1913.

Wege die Bedeutung der verschiedenen Eiweißstoffe für die Ernährung untersucht werden sollte. Ich darf behaupten, daß die Versuche von Osborne und Mendel auf den meinigen fußen und durch sie angeregt worden sind.

Die Versuche von Osborne und Mendel sind allerdings insofern vollkommener als die meinigen, als sie in ihrem Futtergemische nur je einen reinen Eiweißstoff hatten und mit ihrem Futtergemisch, das „eiweißfreie Milch" enthielt, den Nährwert einer größeren Zahl verschiedener reiner Eiweißstoffe vergleichen konnten, während sich in meinem Futter zunächst ein Gemisch verschiedener, bekannter Eiweißstoffe fand und dieses Gemisch erst viel später, jedoch schon vor dem Erscheinen der Osborne-Mendelschen Arbeiten mit Erfolg auf Hühnereiweiß — freilich im chemischen Sinne auch keinen reinen Eiweißstoff — beschränkt werden konnte. Wie man aus meinen Versuchen der Reihe IV ersieht, hatte auch ich die ausgesprochene Absicht, meine Versuche auf andere reine Eiweißstoffe auszudehnen, für deren Darstellung wir die durch Thomas B. Osborne ausgebildeten Methoden besitzen. Durch die Versuche von Osborne und Mendel, die in so einwandfreier Weise die Bedeutung zeigen, die die verschiedenen Eiweißstoffe für das Wachstum von Ratten besitzen, wurden solche Versuche für mich gegenstandslos.

Dem Mangel meiner Versuche steht aber gegenüber, daß ich mich nicht nur darauf beschränkte, junge Tiere bis zu einem bestimmten Gewichte aufzuziehen, sondern meine Versuche auch auf deren Nachkommenschaft ausdehnte Versuche, die mir in so hohem Maße eins kosteten — nämlich Zeit. Wie wir sahen, waren gerade solche Versuche für die Wertung einer Nahrung von besonderer Bedeutung.

Beiträge zur Ausscheidung des Kaliums bei einer Malariaerkrankung.

Von

Aladár Elfer und Béla v. Purjesz.

(Aus dem Laboratorium der Medizinischen Universitätaklinik in Kolozsvár.)

(Eingegangen am 1. Mai 1914.)

Das Verhalten des Kaliums im Organismus unter normalen und pathologischen Verhältnissen läßt sich auch heute trotz vieler Untersuchungen in dieser Richtung schwerer studieren, als es bei anderen Mineralien ausführbar ist. Dieser Umstand wird schon vor 43 Jahren von E. Salkowski erwähnt, und wir können sagen, daß wir behufs dieser Frage auch heute noch in keiner vorteilhafteren Lage sind. Unsere Verfahren zur Bestimmung des Kaliums beanspruchen eine größere Gewandtheit in der chemischen Technik; ihre Durchführung ist umständlich und beansprucht eine längere Zeit; dies bietet zum Teil eine Erklärung, weshalb gerade die Ausscheidungsverhältnisse des Kaliums in der Klinik weniger bekannt sind. Neuberg u. Albu erwähnen, daß die Ausscheidung des Kaliums bei den verschiedenen Nahrungsmitteln weniger studiert ist, und die unter pathologischen Verhältnissen gefundenen Angaben sind außerdem schwieriger zu verwerten. Die seitdem vergangenen 8 Jahre haben — unseres Wissens — über die Ausscheidungsverhältnisse des Kaliums keinen günstigeren Aufschluß gegeben; und deshalb halten wir es nicht für uninteressant, unsere Angaben über die Ausscheidung des Kaliums unter pathologischen Verhältnissen mitzuteilen. Unsere Mitteilung wird auch dadurch begründet, daß unsere Beobachtungen sich gerade auf einen Fall von Wechselfieber beziehen.

Heute ist es schon allgemein bekannt, daß sich bei fieberhaften Erkrankungen auch in der Ausscheidung der Mineralien eine bedeutende Abweichung zeigen kann. Abgesehen von der reichlicheren Entleerung N-haltiger Stoffe, ist es bekannt, wie allgemein die Eigenschaft der fieberhaften Erkrankungen ist, daß sie mit Kochsalzretention verbunden sind, während im Gegenteil die K-Ausscheidung erhöht ist. Beim Wechselfieber, trotz der hochgradigen Temperaturerhöhung, der infektiösen Natur der Krankheit, ist die obengenannte Eigenschaft des fieberhaften Urins in bezug auf die Mineralien nur teilweise zu finden. Es ist uns die alte Bemerkung von Prof. Friedrich v. Korányi bekannt, daß in zweifelhaften Fällen das abweichende Benehmen der einzelnen Bestandteile des Urins bei Wechselfieber eventuell differentialdiagnostisch verwendbar sei. Heute, wo zur Diagnose der malarischen Infektion die Untersuchung des Blutes des beobachteten Kranken die entscheidende Methode bildet, leitet uns natürlich in der Untersuchung der Ausscheidungsverhältnisse der einzelnen Mineralien bei Malaria nicht der oben genannte Standpunkt.

Alle diejenigen, die die Ausscheidung der Mineralien bei Malaria beobachtet haben, sind zu dem Schluß gelangt, daß in der fieberhaften Periode — im Gegenteil zu anderen fieberhaften Erkrankungen — keine Kochsalzretention zu beobachten ist. Die Beobachtungen über das K stimmen dagegen mit den entscheidenden Angaben Salkowskis überein, die er bei Pneumonie, Febris recurrens, Erysipel und Typhus abdominalis gefunden hat.

In der uns zur Verfügung stehenden Literatur sind auch die Angaben über den Stoffwechsel des K bei Malaria sehr lückenhaft.

Betrachten wir nämlich entweder die Angaben von v. Moraczewsky, Hitzig oder die neueren von v. Terray, so finden wir in denselben die Ausscheidungsverhältnisse des K im Urin während der fieberhaften Periode der fieberlosen Periode gegenübergestellt, aber die Verallgemeinerung dieser Angaben ist nicht ganz einwandfrei.

In einem Falle von Febris intermittens quotidiana (v. Moraczewsky) ist auf die Untersuchung der mit dem Kot entleerten K-Menge verzichtet, das ist jedenfalls als ein Fehler zu betrachten,

um so mehr, da hier von einer Beobachtung von 24 Stunden die Rede ist, obschon wir eingestehen müssen, daß einer Harnuntersuchung entsprechend, die in einer Zeit von 24 Stunden 3 bis 4 mal vorgenommen wurde, keine derartige Kotuntersuchung durchgeführt werden kann. Aber die allein mit dem Urin ausgeschiedenen K-Werte sind gewiß nicht zu verallgemeinern. Diese Arbeit gibt uns einen Aufschluß, wie die Ausscheidungsverhältnisse im Urin bei Malaria während der fieberhaften und fieberlosen Periode beschaffen sind, aber nur während einer Zeitdauer von 24 Stunden.

Die entsprechenden Werte in bezug auf den Kot konnte der Autor natürlich nicht angeben, und so ist vielleicht seine Bemerkung nicht ganz gerechtfertigt. „Die Resultate dieser Untersuchung bieten so wenig Neues, daß die Besprechung kaum gerechtfertigt ist." Nach seinen Ergebnissen ist die Ausscheidung der N-haltigen Stoffe mit der Temperaturerhöhung gestiegen resp. gefallen. Die Cl-Ausscheidung ist im Fieber absolut und relativ gestiegen, mit dem Temperaturabfall gefallen und während der Apyrexie wieder gestiegen. Das K reagierte in einer ähnlichen Weise wie das Cl. In bezug auf die tägliche Ausscheidung erwähnt er eine relativ verminderte Cl- und vermehrte K-Ausscheidung.

Hitzig hat schon in 6 Malariafällen zum Teil Untersuchungen über die Mineralstoffe durchgeführt; er stützt sich aber in 5 Fällen auf Cl-Bestimmungen mit dem Volhardschen Verfahren und teilt nur im 6. Falle auch K-Werte mit (dieselben Zahlen wie bei v. Moraczewsky). Wir finden dieselben K-Werte in den Arbeiten von Hitzig, auf die sich auch v. Moraczewsky in seinen Arbeiten gestützt hat. Gleichfalls sind auch die Werte von v. Terray nicht zu verallgemeinern, da diese sich eher auf den Kochsalz-Stoffwechsel beziehen; er teilt bei seinen 3 Fällen K-Werte nur in einem Falle mit, und zwar von einem Tage während der fieberhaften Periode einer Quartana-Erkrankung. Natürlich haben v. Terray, wie v. Hitzig und v. Moraczewsky, ferner v. Limbeck, Rem Picci und Cacciani die Kochsalzausscheidung eindringlich beobachtet, abgesehen von den älteren Untersuchungen (Traube und Jochmann, Sydney-Ringer usw.).

Wir haben unsere Untersuchungen mit einem 23 Jahre alten Manne ausgeführt, und zwar hatten wir die Absicht, neben Berücksichtigung der Beziehung zwischen Aufnahme und Ausscheidung der N-haltigen Stoffe, des Na und Cl, hauptsächlich die K-Ausscheidung zu beobachten. Wir haben die früheren Beobachter als Beispiel genommen, die hauptsächlich die Entleerung der obengenannten Stoffe in fieberhaften und fieberlosen Perioden untersucht haben. Weil wir aber einen kompletten K-Stoffwechselgang studieren wollten, haben wir unsere Untersuchungen — mit Rücksichtnahme der gegebenen Umstände — auf eine längere Zeit ausgedehnt. Wir haben unseren Kranken 8 Tage lang beobachtet, die Regel der Stoffwechseluntersuchungen fest einhaltend. Aus der Anamnese können wir erwähnen, daß die mit Schüttelfrost einhergehende Temperaturerhöhung zum ersten Male 4 Tage vor der Aufnahme in die Klinik (26. VII. 1913) aufgetreten ist. Beim Kranken war — abgesehen von der erweiterten Milzdämpfung — keine besondere Organveränderung nachweislich. Im Blute waren Tertianaparasiten sichtbar.

Nachdem sich beim Kranken täglich die Wechselfieberanfälle einstellen, und zwar in einem ziemlich schweren Maße, mußten wir die medikamentlose Beobachtung unterbrechen, indem wir unserem Kranken nach 2tägiger neutraler Behandlung 4 Tage hindurch täglich $1^1/_2$ g Chininum sulfuricum verabfolgten. Daher bilden die Daten, die an den durch Anfälle besetzten Tagen geschöpft wurden, unsere eigentlichen Resultate, die sich auf die fieberhafte Periode der Malariainfektion beziehen. Zur Vervollkommnung unseres Studiums ließen wir dann unseren Kranken 2 Tage lang wieder medikamentfrei, da wir dann über einen Vergleich mit den früheren zwei Perioden verfügten.

Unser Kranker trank 8 Tage hindurch täglich 2 l Milch mit 10 Stücken Würfelzucker und aß außerdem 250 g Semmel. Jene Diät entspricht laut unseren Untersuchungen einer täglichen Menge von 14,07 g N, 2,28 g Na, 3,88 g Cl und 2,90 g K. Dieses Verhältnis ändert sich erst am 5. Tage; als unser Kranker mehr Semmel bekommt, wird selbstverständlich der in den Organismus eingeführte Mehrbetrag in Rechnung gezogen. Der Kranke ruhte während der ganzen Dauer der Untersuchung, so daß wir den ungefähren Caloriengehalt (2200 Cal.) bei seinem Körpergewicht von 66,40 kg für genügend genau schätzen.

Die Bestimmung des Gesamt-N machten wir mit der Kjeldahlschen Methode. Die Bestimmung des Cl im Urin bewerkstelligten wir einfach laut dem Verfahren Volhards. Die Bestimmungen des K und Na geschahen nach den Regeln der quantitativen Analyse vor allem durch die Bestimmung der gesamten Alkaliwerte, worauf wir den Wert des K mit Platinchlorid erhielten.

Der Kot der einzelnen Perioden wurde mit Carmin abgegrenzt, sodann bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in Untersuchung genommen. Den Gesamt-N bestimmten wir abermals mit der Kjeldahlschen Methode; das K und Na erhielten wir nach sehr vorsichtiger Verkohlung nach dem bekannten Verfahren. Das Chlor bestimmten wir aus der Schmelze mit $K_2CO_3 + KNO_3$. Unsere gesamten Reagenzien wurden von Kahlbaum bezogen; über deren Alkalifreiheit [$Ba(OH)_2 + BaCl_2$] überzeugten wir uns selbst. Der Kranke trank während 8 Tagen insgesamt 2400 ccm Wasser, dessen Alkali- und Cl-Gehalt wir nicht in Betracht zogen. Jene Daten (0,024 g Na, 0,005 g K und 0,02 g Cl während 8 Tagen) beeinflussen unsere erhaltenen Werte durchaus nicht.

Tabelle I.

Zeit	Urin		N-Ausscheidung		Cl-Ausscheidung		Na-Ausscheidung		K-Ausscheidung	
	Menge	Spez. Gew.								
	ccm		g	%	g	%	g	%	g	%
Vorm. 8 bis nachm. 4 Uhr. Fieberfrei	516	1028	11,69	2,28	2,38	0,46	0,667	0,13	0,744	0,14
Nachm. 4 bis 10 Uhr. Schüttelfrost und Fieberperiode . . .	—	1022	1,25	3,56	0,497	1,42	0,174	0,49	0,170	0,48
Nachm. 10 bis früh 8 Uhr. Subfebril, später fieberfrei. .	320	1030	7,04	2,20	0,946	0,29	0,40	0,12	1,053	0,32

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß wir die 24stündige Periode in 3 Teile teilten, und zwar umfaßt die erste Periode die Zeit während des Anfangs des Schüttelfrostes, die zweite den Schüttelfrost selbst und die fieberhafte Periode; hingegen enthält die dritte hauptsächlich die fieberfreie Zeit. Von diesen Daten ist nichts Bedeutendes zu bemerken.

Die reichliche Entleerung der N-haltigen Stoffe ist eine altbekannte Tatsache. Das Benehmen des Na und Cl beweist ebenfalls, daß während des Schüttelfrostes und der fieberhaften Periode davon relativ mehr entfernt wird als in den Perioden vor dem Schüttelfrost und nach dem Fieber. Das Verhalten

des K ist zwar ähnlich, jedoch fällt hier das Maximum der Ausscheidung in die fieberfreie Periode; hingegen ist die prozentuale Ausscheidung, sowohl des Na als auch des Cl, gleichzeitig die geringste. Jene Beobachtung v. Terrays, laut der in der fieberhaften Periode bedeutend mehr K als Na ausgeschieden wird, bestätigen unsere Erfahrungen nur teilweise; denn die in der vorausgehenden und nachfolgenden Periode ausgeschiedene K-Quantität ist auch größer als die des Na.

Wir schätzen demnach die Daten eines 24stündigen Stoffwechsels wertvoller ein, als die während solcher Perioden erhaltenen.

Tabelle II.

Tage	Einfuhr	Ausscheidung			Bilanz	Urinmenge	
	g	Urin	Kot	Zus.		ccm	
1	14,07	21,98	3,46	25,44	−11,37	870	N
2	14,07	18,65	3,46	22,11	− 8,04	840	
Zus.	28,14	40,63	6,92	47,55	−19,41		N
1	2,28	1,241	0,31	1,551	+0,729		Na
2	2,28	1,308	0,31	1,618	+0,662		
Zus.	4,56	2,549	0,62	3,169	+1,391		Na
1	2,898	1,967	1,46	3,427	−0,529		K
2	2,898	1,464	1,46	2,924	−0,026		
Zus.	5,796	3,431	2,92	6,351	−0,555		K
1	3,88	3,822	0,325	4,147	−0,267		Cl
2	3,88	3,528	0,325	3,853	+0,022		
Zus.	7,76	7,350	0,650	8,000	−0,245		Cl

In der Tabelle II sehen wir das Verhältnis des mit dem Urin und Kot entfernten N, Na, K und Cl zur Einfuhr.

Bei sehr großem N-Defizit ist eine ausgesprochene Na-Retention erkennbar. Beim Cl ist fast ein Gleichgewicht zu bemerken. An den 2 fieberhaften Tagen ist ein K-Verlust von $^1/_2$ g wahrnehmbar. Von welcher Bedeutung bei der Beurteilung des K-Stoffwechsels die Untersuchung des Kotes im Falle einer Malariaerkrankung ist, geht daraus hervor, daß sich infolge einer Vernachlässigung der Untersuchung des Kotes eine bedeutende K-Retention herausstellte (2,37 g). Die 2. Periode umfaßt 4 Tage. Der Kranke bekommt täglich $1^1/_2$ g Chininum

sulfuricum. Am 1. Tage bekommt unser Kranker noch einen Anfall, aber von da an ist er fieberfrei.

Tabelle III.

Tage	Einfuhr	Ausscheidung			Bilanz	Urinmenge	
	g	Urin	Kot	Zus.		ccm	
1	14,17	15,94	2,007	17,970	− 3,477	800	N
2	14,17	16,75	2,007	18,757	− 4,587	845	
3	14,92	19,70	2,007	21,707	− 6,787	1660	
4	14,17	16,40	2,007	18,407	− 4,237	2020	
Zus.	57,43	68,79	8,028	76,818	− 19,388		N
1	2,28	2,462	0,385	2,847	− 0,560		Na
2	2,28	2,056	0,385	2,441	− 0,385		
3	2,54	4,922	0,385	5,307	− 2,767		
4	2,28	3,272	0,385	3,657	− 1,377		
Zus.	9,38	12,712	1,540	13,252	− 3,872		Na
1	2,898	1,997	0,77	2,767	+ 0,131		K
2	2,898	1,422	0,77	2,192	+ 0,706		
3	2,958	1,932	0,77	2,702	+ 0,256		
4	2,898	2,548	0,77	3,318	− 0,420		
Zus.	11,652	7,899	3,08	10,979	+ 0,673		K
1	3,88	3,192	0,402	3,594	+ 0,286		Cl
2	3,88	3,363	0,402	3,765	+ 0,115		
3	4,58	7,146	0,402	7,548	− 2,968		
4	3,88	7,070	0,402	7,472	− 3,592		
Zus.	16,22	20,771	1,608	22,379	− 6,159		Cl

In dieser Periode konnte die Bewertung unserer Daten durch die Dosierung des Chinin. sulfur. einigermaßen beeinflußt werden. Allenfalls ist der N-Verlust der Malariainfektion zuzuschreiben. Derart könnten wir auch die erhöhte Na- und Cl-Ausscheidung erklären. Bei der am 3. und 4. Tage aufgetretenen Polyurie ist hauptsächlich eine erhöhte Ausscheidung des Na und Cl erkennbar. In jenem Falle ist es auch nur eine bei nach fieberhaften Krankheiten gewöhnlich vorkommende Kochsalzdiurese. Beim K wurde nur am 4. Tage fast $^1/_2$ g Verlust beobachtet. Also ist im Gegensatze zur 1. Periode eine geringe Retention wahrnehmbar. Es ist auffallend, daß in dieser Periode, ebenso wie in der 1. Periode, die erhöhte K-Ausscheidung verhältnismäßig erst später eintritt, als die Entleerung des Na und Cl, was sich in der 3. Periode noch mehr zeigte.

Tabelle IV.

Tage	Einfuhr	Ausscheidung			Bilanz	Urinmenge	
	g	Urin	Kot	Zus.		ccm	
1	14,07	13,23	2,385	15,615	−1,545	1120	N
2	14,07	14,55	2,385	16,935	−2,865	1500	
Zus.	28,14	27,78	4,770	32,550	−4,410		N
1	2,28	1,608	0,046	1,659	+0,626		Na
2	2,28	1,680	0,046	1,726	+0,554		
Zus.	4,56	3,288	0,092	3,380	+1,180		Na
1	2,898	3,492	0,525	4,017	−1,119		K
2	2,898	3,591	0,525	4,116	−1,218		
Zus.	5,796	7,083	1,050	8,133	−2,337		K
1	3,88	3,528	0,06	3,588	+0,292		Cl
2	3,88	4,200	0,06	4,260	−0,380		
Zus.	7,76	7,728	0,12	7,848	−0,088		Cl

In dieser Periode, als unser Kranker fieberfrei ist, können wir nämlich wieder eine einflußfreie Beobachtung der obengenannten Mineralien vollziehen. Diese Daten dienen uns als Vergleich zu den in der 1., d. h. fieberhaften Periode gefundenen Angaben: ein geringer N-Verlust, eine mäßige Na-Retention, ein Gleichgewicht des Cl und ein riesiger K-Verlust sind die Resultate unserer Angaben; während in der 1. Periode der N-Verlust ein großer ist, erhalten wir dennoch einen, wohl viel geringeren K-Verlust. Die Ausscheidung des Na und Cl ist von einem gleichen Verlaufe.

In der Periode der Chinindosierung ist die erhöhte Ausscheidung des Na und Cl gut zu beobachten. Die an dem 3. und 4. Tage sichtbare starke Kochsalzausscheidung ist — wie wir es bereits erwähnten — auch bei anderen fieberhaften Erkrankungen in der fieberfreien Periode zu beobachten; ja sogar wenn wir die angeführte Quantität des Na und Cl in Betracht ziehen, so bemerken wir, daß an den beiden mit Anfällen besetzten Tagen nebst einer bedeutenden Na-Retention der Cl-Verlust nur ein unbedeutender ist.

Demnach können wir behaupten, daß bei einer Malariainfektion nebst einem hohen N-Verlust hauptsächlich in der Ausnützung des K eine Störung vorhanden ist. Es ist

aus unseren Resultaten ebenfalls erkennbar, daß bei ausreichender Ausnützung des Na, Cl und des K noch ein starkes Negativum im K-Stoffwechsel vorhanden ist, wenn schon ein zeitweiliger Verlust bei den zwei vorher erwähnten Elementen nicht mehr bemerkbar ist. Das Verhalten des K ist mit den N-haltigen Stoffen in dieser Hinsicht fast identisch; jedoch ist das quantitative Verhältnis ein umgekehrtes. Das N-Defizit ist nämlich in der fieberhaften Periode das bedeutendste.

Zum Schlusse können wir die Bemerkung nicht unterlassen, daß sich unsere Untersuchung auf einen schwereren Fall einer Tertianainfektion bezieht, und betonen jenen Umstand, daß unsere Angaben aus einer ganz frischen Malariainfektion resultieren. Die Beurteilung unserer Daten, im Vergleiche mit den diesbezüglich in der Literatur vorhandenen, sehr geringen Angaben, muß uns jedoch bezüglich einer Verallgemeinerung zur strengen Vorsicht mahnen.

Literatur.

Salkowski, Untersuchungen über die Ausscheidung der Alkalisalze. Virchows Archiv **53**, 209.

v. Moraczewsky, Über die Ausscheidung der Harnbestandteile bei Fieberbewegungen. Virchows Archiv **155**, 11.

v. Terray, Zeitschr. f. klin. Med. **26**.

Albu-Neuberg, Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels. Berlin 1906.

Morawitz, Pathologie des Wasser- und Mineralstoffwechsels. — Oppenheimer, Handbuch der Biochemie **4**, 2, 238.

Über Nebennierenkephalin und andere Lipoide der Nebennierenrinde.

Von

Richard Wagner (Wien).

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 1. Mai 1914.)

I. Vorbemerkungen.

Die chemische Zusammensetzung der Nebenniere ist trotz der hohen physiologischen und pathologischen Bedeutung dieses Organes, wenn man vom Adrenalin absieht, noch wenig klargestellt. Das gilt namentlich für die in der Nebennierenrinde vorkommenden Phosphatide, was nicht zuletzt seinen Grund in der schweren chemischen Faßbarkeit dieser Körper hat. Eine Aufklärung erscheint um so wünschenswerter, als die Rindensubstanz der Nebenniere sehr reich an Lipoiden ist. Das geht schon aus dem mikroskopischen Verhalten hervor. Den Morphologen war schon längst die Tatsache bekannt, daß das allenthalben in der Wirbeltierreihe vorkommende Interrenalgewebe ausgezeichnet ist durch Einlagerung fettähnlicher Lipoidgranula, der sog. Rindenkörner, die in der älteren Literatur als Fettkörnchen beschrieben wurden. Nach Biedl[1]) gehört die Nebenniere zu den lipoidreichsten Organen, indem mehr als $^1/_3$ der gesamten Trockensubstanz aus Fett und Lipoid besteht. An dieser Stelle kann von den zahlreichen Arbeiten, die mit histologischen und mikrochemischen Methoden die Rindenkörner untersuchten, abgesehen werden. Es seien nur in Kürze die wichtigsten Ergebnisse der chemischen Untersuchung aus den letzten Jahren angeführt. Abgesehen von dem seit langem als chemischen Bestandteil der Nebennieren-

[1]) Biedl, Innere Sekretion, II. Aufl., 2, 61, 1913.

rinde angeführten Lecithin finden sich von der „Lipoid"gruppe zugehörigen Stoffen bis 1910 angegeben:

Nebennierenjecorin [Manasse[1])],
Protagon [Orgler[2]],
Kephalin [Orgler, Biedl[3])],
Hohe Fettsäuren [Rosenheim und Tebb[4])],
Sphingomyelin [Rosenheim und Tebb[4])],
Cholesterinstearat [Rosenheim und Tebb[4])],
Cholesterinpalmitat [Rosenheim und Tebb[4]), Biedl],
Cholesterincarnaubat (Biedl).

Doch liegen ausreichende Analysen nur spärlich vor. Die Existenz des Jecorins und Protagons ist mehr als zweifelhaft und auch der Nachweis des Kephalins, des Sphingomyelins und der Cholesterinester teils unzureichend belegt, teils sehr anfechtbar.

Im Jahre 1910 erschien aus dem hiesigen Institut eine Dissertation von M. Goldschmidt[5]), die eine Übersicht der aus der Nebennierenrinde mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahierten Lipoide, zahlreiche Analysen und eine vorläufige Gruppierung dieser Körper beibringt. Diese Untersuchung, wenn sie auch aus äußeren Gründen vorzeitig abgebrochen werden mußte, enthält für die Orientierung wichtige Befunde, über die ich hier kurz berichten muß, da sie, abgesehen von der Dissertation, nirgends mitgeteilt sind.

Es wurden 250 Stück Nebennierenrinden vom Rind in 95%igem Alkohol konserviert, dann mit heißem absoluten Alkohol und mit niedrigsiedendem Petroläther extrahiert. Das Ergebnis der Untersuchung ist kurz folgendes: Im ersten, wässerig-alkoholischen Extrakt, dem Härtungsalkohol, wurde ein in grünen Flocken ausfallender Farbstoff und ein koagulabler Eiweißkörper in geringer Menge nachgewiesen. Das hierauf im Luftstrom bei 37° getrocknete und pulverisierte Material wurde mit kochendem absoluten Alkohol am Rückfluß-

---

[1]) Manasse, Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 478, 1885.

[2]) Orgler, Salkowskis Festschr. Berlin 1904, S. 285.

[3]) Biedl, l. c.

[4]) Rosenheim und Tebb, Proc. of the Physiol. Soc., 27. Februar, 1909.

[5]) Goldschmidt, Beitrag zur Chemie der Nebennierenrinde. Inaug.-Diss. Straßburg 1910.

kühler ausgezogen, dieser Extrakt nach dem Eindampfen im Vakuum zur Sirupkonsistenz durch Eintropfen in absolutes Aceton in eine acetonlösliche und acetonunlösliche Fraktion zerlegt. Der in Aceton unlösliche Anteil konnte weiter nach Lösung in Petroläther durch absoluten Alkohol in einen alkohollöslichen Teil (Lecithinfraktion) und einen alkoholunlöslichen (Kephalinfraktion) getrennt werden. Die Kephalinfraktion wurde dann durch Äther in zwei Substanzen zerlegt: die ätherlösliche zeigte Zusammensetzung eines Monoaminomonophosphatides und Eigenschaften, wie sie annähernd dem Gehirnkephalin entsprechen, und wurde vorläufig als Nebennierenkephalin bezeichnet. Die ätherunlösliche Substanz erwies sich als phosphorreicher (N : P = 2,2 : 1). Sie wurde als ein Diaminomonophosphatid aufgefaßt, das möglicherweise dem von Rosenheim und Tebb als Sphingomyelin angesehenen Körper entspricht. Die Zusammensetzung der in hellbraunen durchsichtigen Schüppchen erhaltenen, nicht weiter gereinigten Substanz (C = 53,58 %, H = 10,39 %, N = 2,14 %, P = 2,17 %) wich übrigens sehr erheblich von jener des Thudichumschen[1]) Sphingomyelins aus Gehirn (C = 65,37 %) ab.

Die Lecithinfraktion suchte Goldschmidt durch Metallsalze zu zerlegen; doch erhielt er keine besser charakterisierten Produkte. Vermutlich scheiterte der Versuch an der Zersetzlichkeit des Nebennierenlecithins (s. u.).

Aus der in Aceton löslichen Fraktion krystallisierte zuerst nach Einengung zur Sirupkonsistenz bei 8° in weißen doppeltbrechenden, sudanfärbbaren Kügelchen (Globuliten) eine Substanz aus, die aus heißem absoluten Alkohol umkrystallisiert wurde, keinen Phosphor, wohl aber Stickstoff enthielt und ihren Eigenschaften und der Zusammensetzung nach (C = 75,44 %, H = 12,27 %, N = 1,69 %, O = 10,60 %) den Thudichumschen Aminolipotiden an die Seite zu stellen wäre. Goldschmidt bezeichnet sie als Nebennierenbregenin. Daneben krystallisierte aus der Acetonlösung Cholesterin aus (Schmelzpunkt 145 bis 146°; Analyse).

Nach der Behandlung mit heißem Alkohol wurde das

[1]) Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Tübingen 1901.

Nebennierenpulver wieder getrocknet und mit Äther und Petroläther unter Schütteln kalt extrahiert. Nach Einengung dieses Extraktes im Vakuum wurde eine weiße Substanz erhalten, die aus heißem Alkohol in feinen, rosettenförmig angeordneten Nadeln krystallisierte und nach 3maligem Umkrystallisieren einen konstanten Schmelzpunkt von 58,5 bis 59° (n. k.) aufwies. Sie erwies sich durch Analyse, Verseifung und Indentifizierung der Fettsäuren als Dipalmitostearin[1]),

$C_{53}H_{102}O_6$:

Berechnet:	C 76,26%.	Gefunden:	C 76,23; 76,23%.
	H 12,23%.		H 12,42; 12,55%.

Wie mir Herr Professor Hofmeister mitteilt, hat Herr Dr. Fromhold bei einer späteren, im hiesigen Institut ausgeführten Bearbeitung der Nebennierenrinde das Vorkommen dieses Fettes mit dem Schmelzpunkt 58 bis 59° und des kephalinähnlichen Körpers bestätigt. Hingegen vermochte er das Aminolipotid (Nebennierenbregenin) nicht wiederzufinden[2]).

Auf Anregung von Herrn Professor Hofmeister habe ich die Goldschmidtschen[3]) Versuche wieder aufgenommen. In einem Vorversuche habe ich mich im wesentlichen unter Benützung der Goldschmidtschen Extraktionsmethode nochmals in Kürze über die in der Rinde enthaltenen Lipoide orientiert und im Hauptversuch nur auf die Charakterisierung des Nebennierenkephalins beschränkt. Was sich an Nebenbefunden noch erheben ließ, soll gleichfalls kurz Erwähnung finden. Manches mußte leider wegen der schlechten Ausbeute unerledigt bleiben; doch dürften meine Erfahrungen bei weiteren einschlägigen Untersuchungen von Nutzen sein.

---

[1]) In Goldschmidts Dissertation ist der Körper irrtümlich als Palmitodistearin bezeichnet, obgleich die von ihm berechneten Zahlen nur auf Dipalmitostearin stimmen. Das letztere ist übrigens schon im Rindstalg, Hammeltalg (Bömer, Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel **17**, 353, 1909), dann im Enten- und Gansfett (Klimont und Meisels, Monatsh. f. Chem. **30**, 341, 1909) nachgewiesen.

[2]) Es ist dazu zu bemerken, daß Goldschmidts Präparate vor der Verarbeitung monatelang in schwachem Alkohol aufbewahrt wurden, während Fromhold und ich nur ganz frisches Material benützten. Vielleicht ist dies der Grund für die Verschiedenheit einzelner Befunde.

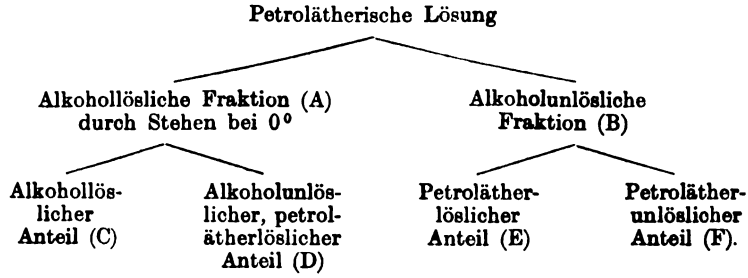
[3]) Goldschmidt, l. c.

II. Versuche zur getrennten Darstellung der lipoiden Bestandteile.

In dem mit 500 Stück Rindernebennieren durchgeführten Vorversuch konnte ich im wesentlichen Goldschmidts Befunde bestätigen. Es konnte nachgewiesen werden: im kaltgewonnenen Alkoholextrakt ein in Aceton und Alkohol unlösliches, in Äther lösliches Monoaminomonophosphatid (Nebennierenkephalin), ein in Aceton, Alkohol und Äther unlöslicher, in Chloroform und Benzol löslicher Körper, der sich an der Luft bräunt und stickstoff- und phosphorhaltig ist (vermutlich dem Sphingomyelin früherer Autoren entsprechend), ein in Aceton unlösliches, in Alkohol und Äther lösliches Phosphatid vom Charakter des Lecithins (der mit alkoholischer Chlorcadmiumlösung gefällte Niederschlag hatte einen Stickstoffgehalt von 5,49 %, büßte ihn aber bei einmaligem Umkrystallisieren bis auf 1,39 % ein), endlich stickstofffreie Fette. Ein Körper vom Verhalten eines Aminolipotids wurde nicht erhalten.

Im Hauptversuch, wo es mir hauptsächlich auf die Darstellung und Charakterisierung des kephalinartigen Phosphatids ankam, verfuhr ich unter Benutzung der von Parnas[1]), Baumann[2]) und Renall[3]) gemachten Erfahrungen wie folgt[4]): An 500 Stück Nebennieren vom Rind wurden Rinde und Mark getrennt. Die immer in einzelnen Portionen aufgearbeitete Rindensubstanz wurde bei — 8° festgefroren aufbewahrt, das ganze Material, dessen Gewicht 4335 g betrug, nach dem Auftauen in der Hackmaschine zerkleinert, auf der Schlemmühle

[1]) Parnas, diese Zeitschr. **22**, 411, 1909 und **56**, 17, 1913.
[2]) Baumann, diese Zeitschr. **54**, 30, 1913.
[3]) Renall, diese Zeitschr. **55**, 296, 1913.
[4]) Schema der Fraktionierung im Hauptversuch:



zwischen Porzellansteinen gemahlen, dann zweimal mit dem gleichen Gewicht Aceton zur Entfernung des Wassers gegeschüttelt und schließlich mit dem $1^1/_2$fachen Gewicht absoluten Alkohols zur Entfernung des Acetons geschüttelt. Dann wurde das durch Absaugen getrennte Nebennierenmaterial direkt in niedrigsiedenden Petroläther eingetragen und 2mal mit der 3fachen Menge (auf das ursprüngliche Gewicht der feuchten Organe bezogen) in der Kälte unter Schütteln extrahiert. Durch dieses Verfahren erspart man das für die oxydablen Phosphatide nicht unbedenkliche Trocknen bei 37° im Luftstrom. Die petrolätherischen Extrakte wurden im Kohlensäurestrom stark eingeengt und durch Eintropfen in absoluten Alkohol unter Rühren gefällt. Dabei fiel eine leicht gelblich gefärbte, noch ziemlich schleimige Masse aus (B). Nach Absitzen derselben wurde die alkoholische Lösung (A) abgegossen und der Rückstand (B) nochmals in Petroläther aufgenommen, wobei nur ein Teil in Lösung ging, der als eine nunmehr bröcklige Masse durch neuerliches Eintropfen in absoluten Alkohol gefällt wurde (E). Ein zweiter Teil (F) ging nicht in Lösung, wurde mit Petroläther zentrifugiert, dann in Chloroform gelöst und nach Abdunsten des Chloroforms im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Diese Substanz färbte sich bei Berührung mit Luft rasch bräunlich und erinnerte daher an die im Vorversuch beobachtete, neben dem Kephalin vorkommende, ätherunlösliche Substanz. Sie enthielt Stickstoff und Phosphor und hatte nach Gewichtskonstanz einen Schmelzpunkt = 64° (n. k.).

Die Mikroanalyse nach Pregl ergab die folgenden Zahlen:

1. 4,412 mg : 4,41 mg H_2O; 11,165 mg CO_2
   = 11,19% H; 69,01% C.
2. 3,777 mg : 3,72 mg H_2O; 9,51 mg CO_2
   = 11,03% H; 68,67% C.

Nach den Löslichkeitsverhältnissen zu schließen, liegt hier wieder das sphingomyelinartige Phosphatid früherer Untersucher vor. Es bedarf indes dringend weiterer Untersuchung.

In der alkoholischen Lösung (A) setzten sich beim Stehen bei 0° an der Wand und am Boden des Gefäßes zahlreiche weiße bis gelbliche Krümel (D) ab, die nach Abgießen der klaren alkoholischen Lösung (C) in einem Minimum an Petroläther gelöst und in absolutem Alkohol nochmals zur Krystalli-

sation aufgestellt wurden. Diese Substanz (D) war auch nach nach dem Trocknen nicht pulverisierbar, sondern bildete eine knetbare Masse von braunem Aussehen. Ihr Schmelzpunkt lag bei 53° (n. k.). Sie war phosphorreich, aber stickstoffarm.

Die alkoholische Lösung (C), welche die Lecithinfraktion darstellt, konnte nach dem Einengen im Vakuum mit Aceton in eine Acetonlösung und einen acetonunlöslichen Teil getrennt werden, der mikroskopisch aus zweierlei Gebilden, öligen Tropfen und dunklen, doppeltbrechenden Globuliten bestand. Ich habe diese Fraktion nicht weiter untersucht.

III. Das Nebennierenkephalin.

Das oben beschriebene Rohprodukt (E) wurde in etwa 800 ccm Wasser gebracht und mit Glasperlen unter Kohlensäure 5 Stunden lang geschüttelt; dann wurde durch Glaswolle filtriert, 90 ccm $^n/_1$-Salzsäure in Portionen von 10 ccm eingetragen und die trübe Emulsion zentrifugiert. Endlich wurde abgegossen, mit absolutem Aceton im Zentrifugenglas gehärtet, scharf abgesaugt, rasch in den Vakuumexsiccator übertragen und über konzentrierter Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug etwa 10 g. Nach dem Trocknen bildete dieser Körper eine weiße bis leicht graue Masse, die sich gut pulverisieren ließ und jetzt für analysenrein angesehen wurde, wenn man die Voraussetzung machen darf, daß das für das Gehirnkephalin so ausgezeichnete Reinigungsverfahren mit Salzsäure auch für das Nebennierenkephalin die optimale Methode darstellt. Der Schmelzpunkt der Substanz (E) lag bei 81° (n. k.), also viel tiefer als der des Hirnkephalins (170 bis 180°) und auch der Zersetzungspunkt des von Frank[1]) aus der Leber dargestellten Kephalins.

Bei der Bestimmung der Jodzahl nach Hübl wurden auf 0,4835 g Substanz 0,1966 g Jod verbraucht, das entspricht für 100 g Substanz 40,7. Die Jodzahl von ganz reinem und unter allen Kautelen dargestelltem Gehirnkephalin liegt gewöhnlich bei 70; Frank fand für das Leberkephalin 19.

Ausschlaggebend für die Bezeichnung eines Phosphatides als Kephalin sind abgesehen von der Anwesenheit ungesättigter

[1]) Frank, diese Zeitschr. 50, 273, 1913.

Fettsäuren zurzeit einmal das Verhältnis von N:P = 1:1, sodann seit Parnas, Baumann und Renall der Nachweis des Aminoäthylalkohols als basische Komponente:

Analysen:

1. 4,429 mg gaben nach Pregl 3,98 mg H_2O; 9,625 mg CO_2 = 10,06% H; 59,27% D (Präparat I).
2. 5,040 mg gaben nach Pregl (21°, 734 mm Hg): 0,054 ccm Stickstoff = 1,20% N (Präparat I).
3. 0,649 g verbrauchten nach Neumann 30,21 ccm $^n/_2$-Natronlauge, entsprechend 0,01673 g Phosphor = 2,579% P (Präparat I).
4. 0,8738 g verbrauchten bei Bestimmung nach Kjeldahl 7,1 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure, entsprechend 0,00994 g Stickstoff = 1,138% (Präparat I).

4,5 g dieses Produktes wurden nochmals in der oben beschriebenen Art mit $^n/_1$-Salzsäure gereinigt und zur Gewichtskonstanz gebracht.

1. N-Bestimmung nach Kjeldahl:

0,5389 g verbrauchten 4,8 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure, entsprechend 0,00672 g Stickstoff = 1,247% (Präparat II).

2. P-Bestimmung nach Neumann:

0,4847 g verbrauchten 24,6 ccm $^n/_2$-Natronlauge, entsprechend 0,01363 g Phosphor = 2,812% (Präparat II).

Ein im Vorversuch dargestelltes Präparat (Präparat III) hatte ergeben:

1. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl:

0,6065 g Substanz verbrauchten 5,6 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure, entsprechend 0,00784 g Stickstoff = 1,29% N.

2. Phosphorbestimmung nach trockener Veraschung mit Sodasalpeter als Magnesiumpyrophosphat:

0,0847 g Substanz gaben 0,0095 g Magnesiumpyrophosphat = 3,13% P.

Unter Einbeziehung der von Goldschmidt erhaltenen Werte ergibt sich:

	Goldschmidt:	Präparat I:	Präparat II:	Präparat III:
C	55,22%	59,27%	—	—
H	8,92%	10,06%	—	—
N	1,48%	1,20, 1,14%	1,25%	1,29%
P	3,21%	2,58%	2,81%	3,13%

Das Verhältnis von N:P ist in allen Fällen 1:1. Es liegt somit unzweifelhaft ein Monoaminomonophosphatid vor. Nach der Fällbarkeit durch Alkohol und Salzsäure gehört es sicher der Kephalinreihe an. Sein Kohlenstoffgehalt würde dem Gehirnkephalin und Eigelbkephalin entsprechen (man vergleiche die Zusammenstellung der Kephalinanalysen bei A. Frank,

l. c.), doch ist der Stickstoff- und Phosphorgehalt etwas niedriger. Der erheblich geringere Kohlenstoffgehalt des Goldschmidtschen Präparates ist vermutlich darauf zu beziehen, daß Goldschmidt die Reinigung mit Salzsäure unterlassen hat.

Um über die Natur der Base Aufschluß zu gewinnen, wurden vergleichende Bestimmungen des Gesamtstickstoffs und des primären Aminostickstoffs im unveränderten Körper und in dessen Hydrolysenprodukten gemacht:

0,5918 g Substanz wurden unter Zusatz einiger Tropfen Natronlauge in Wasser gelöst und auf 50 ccm aufgefüllt.

10 ccm der Lösung gaben nach van Slyke:

1. bei 16° und 761 mm Hg 2,4 ccm N_2,

2. bei 16° und 761 mm Hg 2,3 ccm N_2,

entsprechend 0,00667 g = 1,127% primärem Aminostickstoff (gegen 1,138%, resp. 1,247% Gesamtstickstoff nach Kjeldahl).

Die Hydrolyse von Substanz (E) wurde so wie bei Renall[1]) mit Schwefelsäure vorgenommen: 1,0603 g der Substanz wurden in 100 ccm Wasser gelöst und mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure in 100 ccm Wasser versetzt. Die Hydrolyse vollzog sich bei 56° unter fortwährendem Turbinieren während 44 Stunden. Nach Abfiltrieren der Fettsäuren wurde die Schwefelsäure durch Baryt entfernt, abfiltriert, eingedampft und auf 50 ccm Volumen gebracht.

1. Gesamtstickstoff nach Kjeldahl:

25 ccm der Lösung verbrauchten 4,3 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure, entsprechend 12 mg Stickstoff in der Gesamtmenge.

2. Aminostickstoff nach van Slyke:

10 ccm der Lösung gaben bei 18° und 767 mm Hg 4,6 ccm N_2, entsprechend 11,6 mg Stickstoff in der Gesamtmenge.

In den Hydrolysenprodukten von Substanz (E) fanden sich demgemäß 96,7% des Gesamtstickstoffs als primärer Aminostickstoff wieder.

Dadurch ist ausgeschlossen, daß der vorliegende Körper ein Cholinderivat, also ein Lecithin ist. Daß die erhaltene primäre Aminbase Oxäthylamin ist, wurde durch ihre Überführbarkeit in Oxalsäure sehr wahrscheinlich gemacht. Die Lösung wurde mit Kaliumpermanganat in Substanz gekocht, filtriert, bis das Filtrat farblos und klar war, und Calcium-

[1]) Renall, l. c.

chlorid zugesetzt, wobei eine flimmernde, in Essigsäure persistierende Trübung entstand, die sich in verdünnter Salzsäure löste und auf Ammoniakzusatz wieder auftrat. Auch die sonstigen Reaktionen sprachen für Aminoäthylalkohol:

1. Mit Phosphorwolframsäure entstand in konzentrierter Lösung ein weißer Niederschlag, der beim Verdünnen verschwand. Cholin gibt diesen Niederschlag auch in verdünnter Lösung.

2. Mit Jodjodkalium entstand kein Niederschlag. Beim Cholin entsteht ein schwarzer Niederschlag.

3. Mit Jodwismutkalium kein Niederschlag, während Cholin einen reichlichen braunen Niederschlag gibt.

Nach dem Gesagten ist man durchaus berechtigt, das Nebennierenkephalin trotz seiner etwas abweichenden Zusammensetzung der Kephalingruppe einzuordnen.

Zur Frage der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Hefen und Schimmelpilze.

Von

Alexander Kossowicz (Wien).

(Eingegangen am 2. Mai 1914.)

In der Literatur liegt eine Reihe von positiven Angaben über die Assimilation des Luftstickstoffs durch Schimmelpilze[1]) so von Frank, Berthelot, Puriewitsch, Saida, Remy, Ternetz, Fröhlich, Latham, Lipman, Stahel, Heinze, Löhnis und Pillai (Dematium pullulans) und Peklo und durch Sproßpilze (Hefen[1]), so von Lindner[2]), Löhnis und Pillai, Zikes, Lipman, Will und Scheckenbach vor. Auch ich[3]) konnte eine Anreicherung von Hefenzuchten an Stickstoff auf Kosten des Stickstoffs (der Stickstoffverbindungen) der Luft beobachten. Als ich mich nun auf Anregung des Herrn Professors A. v. Lebedew (briefliche Mitteilung) dem näheren Studium des Chemismus der Stickstoffbindung durch Sproß- und Schimmelpilze zuwandte, machte ich einige Beobachtungen, die mich bald an der Richtigkeit der bisher vorliegenden Befunde über die Fähigkeit der Sproß- und Schimmelpilze zur Assimilation des elementaren Stickstoffs der Luft zweifeln ließen und mich auch zu einer Neuaufnahme der eigenen Versuche unter wesentlich geänderten Versuchsbedingungen veranlaßte.

Bei meinen früheren Versuchen[4]) hatte ich zur Herstellung der Nährlösung Leitungswasser benutzt, um der Angabe ver-

[1]) Siehe Kossowicz, Einführung in die Agrikulturmykologie, I. Teil, Bodenbakteriologie. Berlin 1912, S. 27.

[2]) Wochenschr. f. Brauerei 1905, Nr. 40; Chemikerzeitung 36, 1912, Nr. 68, S. 638.

[3]) Kossowicz, a. a. O. S. 28; Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 253, 1912.

[4]) Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 253, 1912.

schiedener Autoren Rechnung zu tragen, die dem destillierten Wasser eine Giftwirkung auf kleine Hefenmengen zuschreiben. Um nun die damit eingebrachten ungleichen Stickstoffmengen auszuschalten, verwendete ich zu meinen neuen Versuchen ausschließlich das gleiche destillierte Wasser.

Die von mir benutzten, als chemisch reinst von Merck bezogenen Kohlenstoffquellen (Saccharose, Glucose, Mannit) erwiesen sich als stickstoffhaltig; zu einem ähnlichen Befunde kamen kürzlich auch Lindner und Naumann[1]). Der Versuch, diese Stoffe vollkommen stickstofffrei zu erhalten, hatte aber nicht ganz den gewünschten Erfolg. So verwendete ich auch zu meinen neuen Versuchen diese, geringe Spuren von Stickstoffverbindungen enthaltenden Kohlenstoffquellen und begnügte mich damit, den Stickstoffgehalt der Kontrollösung in Abzug zu bringen. Endlich konnte ich feststellen, daß ein Ausschluß der Stickstoffverbindungen der Luft bei längerer Versuchsdauer auf große Schwierigkeiten stößt und die an die Versuchsgefäße angeschlossenen Absorptionsgefäße (mit Wasser, Natronlauge und konzentrierter Schwefelsäure) bei längerer Versuchsdauer in dieser Beziehung versagen.

Von Schimmelpilzen wird ganz besonders für Aspergillus niger (Berthelot, Puriewitsch, Saida, Remy, Ternetz, Latham, Lipman) und Penicillium glaucum (Puriewitsch, Ternetz, Lipman) eine Bindung des elementaren Luftstickstoffs behauptet[2]). Auch Peklo[3]) wies auf die Stickstoffassimilation durch Penicillium hin. Aus diesem Grunde wandte ich diesen zwei Schimmelpilzen meine besondere Aufmerksamkeit zu.

Außerdem wurden zu meinen Versuchen noch Mucor Boidin, Botrytis Bassiana, Isaria farinosa, Cladosporium herbarum, Aspergillus glaucus, Penicillium brevicaule, von Hefen und hefenähnlichen Organismen Saccharomyces validus, Pichia membranaefaciens, Sacch. anomalus, Sacch. ellipsoideus, Monilia candida und Oidium lactis herangezogen.

---

[1]) Wochenschr. f. Brauerei 30, 589, 1913.

[2]) Es gibt allerdings auch negative Befunde, so z. B. von Czapek, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 559, 1902 und Heinze, Landw. Jahrb. 1907, 889.

[3]) Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 2, 280, 1913.

Die benutzte Nährlösung bestand ähnlich wie bei meinen früheren Versuchen[1]) aus: 1000 ccm destilliertem Wasser (statt Leitungswasser), 10 g Saccharose (reinst, früher rein), 2 g Glucose (reinst), 2 g Mannit (reinst, wiederholt gereinigt!), 1 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 0,05 g $CaCO_3$, 0,01 g $CaCl_2$, 0,01 g $FeCl_3$. Zu jedem Versuche wurden je 100 ccm der Nährlösung (in Erlenmeyer-Kölbchen) verwendet. Eine Versuchsserie erhielt bloßen Watteverschluß, die Kölbchen der zweiten Versuchsserie wurden mit drei Absorptionsgefäßen (Wasser, Natronlauge, konzentrierte Schwefelsäure) verbunden. Die Versuchsdauer betrug nur 3 Wochen bei 20°, um durch eine längere Versuchsdauer bedingte Fehlerquellen auszuschalten. Ich ging dabei von der Annahme aus, daß eine etwa erst erforderliche Anpassung der Mikroorganismen an die Assimilation des elementaren Stickstoffs auch innerhalb dieser Zeit eintreten müßte, wenn sie überhaupt stattfindet. Es zeigte sich nun bei diesen Versuchen, daß sowohl die nichtgeimpften Kontrollösungen (6), als auch die mit Hefen bzw. Schimmelpilzen beimpften Nährlösungen, die bloß mit einem Watteverschluß versehen waren, schon innerhalb 3 Wochen Stickstoffverbindungen aus der Luft aufgenommen hatten, und zwar war diese Absorption (Adsorption) bei den beimpften Nährlösungen eine stärkere, bei den verschiedenen Pilzen eine ungleiche; in diesen Zuchten konnte also eine schwache Stickstoffzunahme (0,2 bis 0,3 mg, in einem Falle 0,5 mg) festgestellt werden. In den mit den Absorptionsgefäßen verbundenen Versuchskolben wurde dagegen eine Stickstoffaufnahme nicht wahrgenommen, auch nicht in den Kontrollgefäßen[2]), die schwache Entwicklung

[1]) Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 254, 1912. Die Versuche wurden im Winter durchgeführt. Der Versuchsraum (Laboratorium) wurde unter Verwendung eines eisernen Ofens mit Braunkohle geheizt. In den Abend- und frühen Morgenstunden brannten zur Beleuchtung des Raumes zwei Leuchtgasflammen mit Auerbrennern. Im Laboratorium wurden während der Versuchsdauer — es ließ sich dies nicht vermeiden — ca. 900 andere Pilzkulturen (in Eprouvetten und in Erlenmeyerkölbchen mit Watteverschluß) aufbewahrt.

[2]) Zwei 4 Monate alte sterile Kontrollgefäße zeigten aber ungeachtet der Absorptionsgefäße eine geringe Stickstoffzunahme durch Aufnahme von Stickstoffverbindungen aus der Luft, eine Fehlerquelle, mit der man bei längerer Versuchsdauer zu rechnen hat. Auf die Wasserverdunstung wurde selbstverständlich Rücksicht genommen.

der Hefen- und Schimmelpilze war hier bloß auf Kosten der schon ursprünglich in der Nährlösung befindlichen minimalen Mengen von Stickstoffverbindungen und allenfalls der mit dem Impfmaterial eingebrachten, vor sich gegangen. Die Stickstoffbestimmung wurde nach Kjeldahl vorgenommen.

Auf Grund meiner hier mitgeteilten Versuche läßt sich der Schluß ziehen, daß die geprüften Hefen (Sproßpilze) und Schimmelpilze (darunter auch Aspergillus niger und Penicillium glaucum) bezüglich ihres Stickstoffbedarfs recht anspruchslos sind und schon auf Kosten ganz geringer Stickstoffmengen eine nicht unbedeutende Entwicklung (Vermehrung) zeigen, daß sie die in der Luft befindlichen Stickstoffverbindungen ausnutzen können, nicht aber befähigt sind, den elementaren Stickstoff der Luft zu assimilieren. Es ist sehr zweifelhaft, ob es überhaupt Hefen- (Sproßpilze) und Schimmelpilze gibt, welche diese letztere Eignung zeigen. Eine genaue Überprüfung der übrigen in der Literatur angeführten Pilze (so auch der Torula Wiesneri) auf ihre diesbezügliche Eignung oder Nichteignung, wäre sehr wünschenswert und von großem physiologischen Interesse.

Über das Fibrin und seine Beziehung zu einigen Problemen der Biologie und Kolloidchemie.

Besondere Berücksichtigung des Blutgerinnungsproblems.

Von
E. Hekma.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 4. Mai 1914.)

IV.

Über Gelbildung in flüssig erhaltenem Plasma und Transsudaten unter Säureeinfluß, sowie über die Reversibilität dieser Gele, bzw. über die Eigenschaften ihrer Sole. Nebst einigen Vorbemerkungen über die Bedeutung der Alkalescenz als gerinnungsverzögernder, bzw. hemmender Faktor.

Als sich herausgestellt hatte[1]), daß nicht nur die anscheinend spontan in Citratkochsalz- und Fluornatriumplasma sich bildenden Gele, sondern ebenfalls die unter Serumeinfluß in diesen Flüssigkeiten sowie in Transsudaten hervorgerufenen Gele sich wieder in sehr verdünnter Säure, bzw. schwachem Alkali lösen ließen, während in solchen Säure- bzw. Alkalihydrosolen dann wieder Gelbildung unter verschiedenem Einflusse vor sich gehen konnte, indem letzteren Gele dieselben Kennzeichen zukamen, wie den erstgenannten, drängte sich selbstredend der Gedanke auf, daß entweder die Säure- oder die Alkalihydrosole des in Rede stehenden Kolloids gewissermaßen identisch sein müßten mit natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten (Transsudaten, flüssig erhaltenem Blutplasma, bzw. Blut). Oder mit anderen Worten, das vorliegende Kolloid (von dem erwiesen war, daß ihm im Gelzustand die dem Fibrin eigenen Kennzeichen zuerkannt werden mußten, sollte in natürlichen

[1]) Diese Zeitschr. 63, 204.

Flüssigkeiten vorhanden sein, entweder im Säure- oder im Alkalihydrosolzustande. Es mußte dann dementsprechend auch in den natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten von den gleichen Faktoren Gelbildung hervorgerufen werden können wie in künstlichen Fibrinhydrosolen, es sei denn, in Säure- oder Alkalihydrosolen und umgekehrt; während zugleich auch die verschiedenen Gele in ihren Eigenschaften unter sich Übereinstimmung aufweisen müßten.

Zu der Entscheidung der Frage, ob das betreffende Kolloid in natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten im Säurehydrosolzustande oder aber im Alkalihydrosolzustande enthalten sein könne, war es namentlich notwendig, das Verhalten von natürlichen fibrinogenhaltenden Flüssigkeiten schwachen Alkalien und Säuren gegenüber zu studieren. Denn es durfte ja erwartet werden, daß, falls in diesen Flüssigkeiten das betreffende Kolloid im Säurehydrosolzustande zugegen wäre, unter Alkalieinfluß um den neutralen Punkt herum Gelbildung eintreten würde, während andererseits, wenn das Kolloid in diesen Flüssigkeiten im Alkalihydrosolzustand befindlich wäre, das Auftreten von Gelbildung unter Säureeinfluß (um den neutralen Punkt herum) zu erwarten war, und zwar nach Analogie von dem, was sich bei den künstlichen Fibrin-Säurehydrosolen und Fibrin-Alkalihydrosolen ergeben hatte. Es wurde dann auch demgemäß mit schwachen Alkalien und Säuren den natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten gegenüber experimentiert.

Es stellte sich nun zunächst heraus, daß weder in flüssig erhaltenen Formelementen, freiem Blutplasma noch in Transsudaten beim Hinzufügen von Alkali zu diesen Flüssigkeiten Gelbildung eintritt. Im Gegenteil ergab sich, daß sowohl die anscheinend spontane Gerinnung in Citratkochsalz- und Fluornatriumplasma, wie die Gerinnung unter Serumeinfluß in diesen Flüssigkeiten sowie in Transsudaten, durch einen vorhergehenden Zusatz von Spuren Alkali bereits verzögert wurde, während bei steigender Alkalihinzufügung schließlich ein Punkt erreicht wurde, bei dem unter Serumeinfluß gar keine Gelbildung, bzw. Gerinnung, mehr hervorgerufen werden konnte. Es zeigte sich also, daß auch in dieser Hinsicht wieder eine vollständige Übereinstimmung sich vorfand zwischen dem Verhalten von natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten einerseits und den im

vorigen Aufsatz erwähnten Lösungen von Fibrin in Alkali, bzw. Fibrinalkalihydrosolen, andererseits. Denn auch in letzteren Flüssigkeiten trat ja Gelbildung unter Serumeinfluß (und, wie ich ergänzend hinzufügen möchte, unter Salzeinfluß, sei es unter dem Einflusse von gesättigter NaCl- oder NaF-Lösung bei Zimmertemperatur, oder unter dem Einflusse einiger Prozente NaCl oder NaF bei einer Temperatur von 56°) um so langsamer ein, je nachdem der Alkaligehalt jener Lösung ein höherer war, während bei einem zu großen Alkaligehalt gar keine Gelbildung mehr, weder unter Serumeinfluß noch unter Salzeinfluß, hervorgebracht werden konnte. Ich will dabei nicht versäumen zu bemerken, daß in dieser Hinsicht nicht nur die Alkalescenz, sondern zu gleicher Zeit auch die Konzentration, in der das Fibrin in den künstlichen Fibrinalkalihydrosolen vorhanden ist, sich geltend macht.

Anläßlich der erwähnten Ergebnisse möchte ich einige Bemerkungen machen über die Ursachen des nicht „spontanen" Gerinnens von manchen Transsudaten. Es will mir nämlich scheinen, daß die Alkalescenz dieser Flüssigkeiten dabei eine sehr bedeutende Rolle spielt. Die Transsudatarten, die ich zu meinen Versuchen verwendet habe (Ascites- und Hydroceleflüssigkeiten) reagierten fast durchweg gegen Lackmus sehr deutlich bzw. ziemlich stark alkalisch. Die Ansicht, daß tatsächlich das nicht spontane Gerinnen der Transsudate vorwiegend dem Alkalescenzgrad dieser Flüssigkeiten zuzuschreiben sei, wird meines Erachtens gestützt von der vorher schon erwähnten Beobachtung, daß ich ein paarmal einer Ascitesflüssigkeit begegnet bin, in der auf Zusatz von einer gleichen Menge Aq. dest. Gelbildung eintrat. Ich sehe für diese Beobachtung keine andere Erklärung als die, daß von dem Wasserzusatz die zufälligerweise in diesen Fällen an sich schon verhältnismäßig niedrige Alkalescenz (Lackmus gegenüber; leider habe ich derzeit versäumt, genaue Alkalescenzbestimmungen zu machen) so weit herabgesetzt wurde, daß nunmehr „spontane" Gelbildung vor sich gehen konnte. Ich kann hinzufügen, daß dieses nach einer einfachen einmaligen Wasserverdünnung sich bildende Gel nach tüchtigem Auswaschen in Wasser einen Faserstoff darstellte, dem die vorher erwähnten histologischen und morphologischen Kennzeichen des Fibrins (u. a. positive Weigertfärbung, sowie Hart- und Sprödewerden beim Austrocknen an der Luft,

während die trockenen Stäbchen nach Zurückbringen in Wasser wieder quollen und dabei wie zuvor einigermaßen elastisch wurden) zukamen. Auch ließen sie sich in schwachen Säuren und Alkalien lösen, während in solchen Lösungen wieder Gelbildung hervorgerufen werden konnte. Aus dem Umstande, daß Gelbildung auf Wasserzusatz eintrat, mußte gefolgert werden, daß das nicht „spontane" Gerinnen der Flüssigkeit selbst nicht durch einen äußerst niedrigen Fibrinogengehalt erklärt werden konnte. Allerdings dürfte bei manchen Transsudaten, namentlich Hydroceleflüssigkeiten, der oft recht niedrige Fibrinogengehalt nebst der verhältnismäßig hohen Alkalescenz bei der Beurteilung der Ursachen des nicht „spontan" Gerinnens mit in Betracht gezogen werden müssen. Übrigens ist die Anschauung betreffs der gerinnungsverzögernden Wirkung des Alkalis im Einklang mit Beobachtungen und Ansichten, die in der Literatur zu finden sind. Es möge zum Beleg dessen ein Passus zitiert werden aus einer der grundlegenden Arbeiten[1]) betreffs der Gerinnungslehre, der folgendermaßen lautet: „Die nun angeführten Versuche zeigen also wiederum, daß das abweichende Verhalten meiner Fibrinogenlösungen und des Blutplasmas einerseits und der Hydroceleflüssigkeiten andererseits, wenn sie auf $+56$ bis $+60^0$ erhitzt werden, nicht zu der Annahme von zwei verschiedenen Fibrinogenen berechtigt oder nötigt. Sie zeigen nämlich, daß in den Transsudaten Stoffe enthalten sind, die die Gerinnung des Fibrinogens bei $+56$ bis $+60^0$ verhindern können. Wie diese Versuche lehren, verhält sich also mein Fibrinogen, wenn es in einem fermentfreien und gleichzeitig auch fibrinogenfreiem Transsudate gelöst wird, beim Erhitzen ganz so wie das Fibrinogen der fermentfreien Transsudate, d. h. es gerinnt nicht; und wenn man aus diesen Versuchen einen Schluß über die veränderte, resp. unveränderte Beschaffenheit meines Fibrinogens ziehen wollte, würde er also gewiß dahin lauten, daß mein Fibrinogen ebensowenig ein durch fermentative Einwirkung verändertes wie das Fibrinogen der fermentfreien Hydroceleflüssigkeiten ist. Dieser Schluß wird noch weiter gestützt durch folgende Beobachtung. Die eine der zu den genannten Versuchen verwendeten Hydroceleflüssigkeiten

[1]) Olof Hammarsten: Über das Fibrinogen. Arch. f. d. ges. Physiol. **19**, 606 bis 608, 1879.

wurde mit $^1/_5$ Vol. einer anderen Fibrinogenlösung, die nachweisbar durch ein wenig Ferment verunreinigt war, vermischt und darauf erwärmt. Dieses Gemenge gab eine deutliche Gerinnung beim Erwärmen auf $+ 58^0$ C. Am folgenden Morgen war der Rest dieser Fibrinogenlösung, trotzdem sie über Nacht in einem kalten Zimmer aufbewahrt worden war, teilweise spontan geronnen, und es kann wohl also keinem Zweifel unterliegen, daß die Gerinnung beim Erwärmen in diesem Falle daher rührte, daß die durch ein wenig Ferment verunreinigte Fibrinogenlösung einen schon veränderten Stoff enthielt. — Auch mit solchen Hydroceleflüssigkeiten, die eine nicht sehr unbedeutende Menge Fibrinogen enthielten, habe ich einige Erwärmungsversuche angestellt, wobei ich doch mit Rücksicht auf die schon in der Flüssigkeit befindliche Fibrinogenmenge, die Menge des zugesetzten Fibrinogens nie größer als $0{,}1\,^0/_0$ nahm. Auch unter diesen Umständen konnte ich die Gerinnung des Fibrinogens bei der genannten Temperatur verhindern, aber nicht in allen Fällen. In einigen Versuchen trat zwar keine Gerinnung auf, aber die Versuchsflüssigkeit wurde stark opalescierend. In ein paar anderen Versuchen dagegen entstand ein deutliches feinflockiges Gerinnsel. Den Grund dieses abwechselnden Verhaltens kann ich nicht genau angeben, aber jedenfalls kommen hier zwei Umstände in Betracht: die Konzentration der Flüssigkeit und ihr Gehalt an Alkali. Daß die Konzentration der Flüssigkeit oder richtiger ihr Gehalt an Fibrinogen hier von großem Belang ist, ging daraus deutlich hervor, daß ich in ein und derselben Flüssigkeit je nach der Menge des zugesetzten Fibrinogens beim Erhitzen nur eine Opalescenz oder eine wirkliche Gerinnung hervorbringen konnte. Bei Versuchen mit sehr schwach alkalischen, fast amphoter reagierenden Transsudaten konnte ich dagegen, selbst wenn die zugesetzte Fibrinogenmenge eine sehr kleine ($0{,}050\,^0/_0$) war, die Gerinnung nicht ganz verhindern. Sobald aber der Alkaligehalt um wenig vermehrt wurde, konnte die Gerinnung ganz vollständig verhindert werden. Als Beleg hierfür kann folgendes Versuchsergebnis dienen. Eine seröse Ovarialcystomflüssigkeit, die keine Spur von Fibrinogen enthielt und die fast neutral, richtiger amphoter, reagierte, wurde mit resp. $^1/_5$, $^1/_6$ und $^1/_8$ Vol. Fibrinogenlösung von $0{,}964\,^0/_0$ Fibrinogen vermischt. Diese sämt-

lichen Proben gerannen bei + 57 bis + 58°, wenn auch mit abnehmender Stärke. Mit $^1/_{12}$ Vol. dieser Fibrinogenlösung versetzt, wobei also der Gehalt des Gemenges an Fibrinogen etwa 0,080% war, gerann sie nunmehr nicht beim Erhitzen; sie wurde nur opalescierend. Es zeigt dies die Wirkung einer ungleichen Konzentration. Eine größere Portion dieser Flüssigkeit wurde möglichst genau neutralisiert und darauf in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde darauf mit einer $^n/_{10}$-Natronlauge auf 0,050% Na_2O gebracht, und der andere mit einer entsprechenden Menge Wasser verdünnt. Darauf wurden beide Proben mit je $^1/_5$ Vol. der Fibrinogenlösung vermischt und zuletzt erwärmt. Die neutrale Probe gerann dabei grobflockig, während die alkalische vollständig flüssig blieb. Es kann dies als Beweis für die Wirkung eines ungleichen Alkaligehaltes dienen. Wenn man sich vergegenwärtigt, daß die Hydroceleflüssigkeiten regelmäßig eine, im Verhältnis zu dem Alkaligehalte unbedeutende Fibrinogenmenge enthalten, so liegt gewiß die Annahme sehr nahe, daß das Alkali einer der am kräftigsten gerinnungshemmend wirkenden Bestandteile dieser Transsudate sei. Daß dem auch so sein kann, finde ich sehr wahrscheinlich; aber ich muß doch behaupten, daß auch andere Umstände dabei in Betracht kommen müssen. Ich habe nämlich wiederholt Hydroceleflüssigkeiten beobachtet, die selbst nach vorhergegangener Neutralisation beim Erwärmen auf + 56 bis + 60° nicht gerannen."

Soweit der betreffende Passus, in dem die besonders markanten Zeilen gesperrt angegeben sind. Die Länge des Zitats möge entschuldigt werden erstens dadurch, daß die in ihm enthaltenen Äußerungen von einem der Altmeister der Gerinnungslehre stammen, und zweitens aus dem Umstande, daß ich auf dieses Zitat mehrmals Bezug zu nehmen genötigt sein werde. An dieser Stelle möchte ich nur besonders hervorheben, daß diese Äußerung Hammarstens dahin lautet, daß nicht nur die Gerinnung von Hydroceleflüssigkeiten bzw. Transsudaten, sondern auch von Hammarstens „Fibrinogenlösung" unter Alkalieinfluß verzögert bzw. gehemmt werden kann. Auch möchte ich die Aufmerksamkeit auf die in dem Passus enthaltene Erwähnung lenken, daß in gewissen Fällen anstatt einer regelrechten Gerinnung eine Opalescenz in fibrinogen-

haltigen Flüssigkeiten beobachtet werde beim Erwärmen auf 56 bis 60°, eine Beobachtung, die ich ebenfalls öfters bei meinen mit ein wenig Neutralsalzlösung (NaCl, NaF) versetzten künstlichen Fibrinalkalihydrosolen gemacht habe.

Übrigens geht aus dem Zitat hervor, daß es sich bei meinen Feststellungen der gerinnungswidrigen Wirkung des Alkalis fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten gegenüber gewissermaßen nur um schon längst bekannte Tatsachen handelt[1]). Nur insoweit dürfte in dieser Hinsicht ein Fortschritt vorliegen, daß aus meinen Untersuchungen zu gleicher Zeit unzweideutig hervorgeht, daß betreffs des Alkalieinflusses für künstliche Fibrinalkalihydrosole (Lösungen von Fibrin in sehr schwachem Alkali) dasselbe gilt, was von Hammarsten schon vor 35 Jahren für natürliche fibrinogenhaltige Flüssigkeiten und für „Fibrinogenlösungen" erörtert worden ist, während außerdem sämtliche diesbezüglichen Beobachtungen nunmehr, wie ich später näher ausführen werde, für eine einheitliche Erklärung zugänglich sind[2]).

[1]) Ich möchte nicht versäumen, zu bemerken, daß die gerinnungswidrige Wirkung des Alkalis offenbar auch schon Alex. Schmidt sehr wohl bekannt war. Man vergleiche z. B. die S. 16 und 41 in Alex. Schmidts zusammenfassender Monographie: „Die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen in den eiweißartigen tierischen Körperflüssigkeiten". Dorpat 1876.

[2]) Ich möchte anläßlich der obenerwähnten Tatsachen in aller Kürze auf die Bedeutung derselben für das Verständnis der Ursachen der verschiedenen Gerinnungsgeschwindigkeit differenter Blutsorten hinweisen. Es drängt sich u. a. die Frage auf, inwieweit aus einer verschiedenen Blutalkalescenz die Unterschiede zu erklären seien, die sich in den Gerinnungszeiten des Blutes verschiedener Tiere (und beim Menschen unter verschiedenen bzw. pathologischen Verhältnissen) finden. Auch die Möglichkeit, mittels geeigneter Alkalizufuhr die Gerinnungsgeschwindigkeit bzw. Gerinnungsfähigkeit des Blutes (zu therapeutischen bzw. prophylaktischen Zwecken) beeinflussen zu können, dürfte angesichts der erwähnten Tatsachen ein erhöhtes Interesse erregen. Weiter findet die in der Literatur befindliche Anschauung, daß die unvollständige Gerinnung des Menstrualblutes vorwiegend der Beimischung von alkalischem Uterusschleim zum Blute zu verdanken sei, in der Erklärung der gerinnungsverzögernden Wirkung des Alkalis eine erhebliche Stütze. — Ich will indessen an dieser Stelle auf die gestreiften Gegenstände nicht näher eingehen; ich möchte nur die Aufmerksamkeit darauf gelenkt haben, daß zahlreiche schwebende Fragen unter Berücksichtigung der gerinnungsverzögernden bzw. -hemmenden Wirkung des Alkalis einer endgültigen Lösung bzw. Erklärung nähergeführt werden dürften.

Indem also in natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten durch Alkali keine Gelbildung herbeizuführen war, konnte demgegenüber von Säuren und sauren Salzlösungen um den neutralen Punkt herum reversible Gelbildung in solchen Flüssigkeiten hervorgerufen werden[1]), wie in den folgenden Seiten an Hand einer Anzahl von Versuchsbeispielen dargetan werden wird.

A. Versuchsbeispiele, betreffend die reversible Gelbildung in NaF-Plasma unter Säureeinfluß.

1. Ein Reagensröhrchen wurde mit $1^0/_0$iger H_3PO_4 ausgespült, so daß die Röhrchenwand von der Säure benetzt worden war, während sich am Boden ein paar Tropfen Säure gesammelt hatten. Nunmehr wurde in das Röhrchen formelementfreies Fluornatriumplasma mittels einer Pipette hineingebracht, und zwar so viel, bis (bei Seitenbeleuchtung gegen Gasglühlicht) eine Trübung bemerkbar wurde. Nach 10 Minuten wurde bei diffusem Tageslicht eine starke Trübung beobachtet; es stellte sich bei Seitenbeleuchtung heraus, daß tatsächlich bereits ein äußerst feines Fädchennetzwerk vorlag. Nach $^1/_2$ Stunde war die Fädchenform auch bei diffusem Tageslicht sehr deutlich, das Erzeugnis machte den Eindruck einer zarten geschlossenen Membran, die sich etwas von dem Boden des Röhrchens zurückgezogen hatte. Indem nun das Röhrchen um seine Längsachse gedreht wurde, legte sich das Fädchenwerk einigermaßen zusammen. Sodann wurde tüchtig geschüttelt, wobei das anscheinend voluminöse Erzeugnis sich in ein winziges Fadenknäuelchen verwandelte, das an die Oberfläche der Flüssigkeit stieg.

2. 10 Reagensröhren wurden wie zuvor mit $1^0/_0$iger H_3PO_4 ausgespült; dann wurde wie zuvor formelementfreies NaF-Plasma in die Röhren hineingebracht, bis Trübung wahrnehmbar wurde. Nach einiger Zeit Fädchenwerkbildung. Sämtliche Röhrchen wurden nun geschüttelt. Die zur Oberfläche ge-

[1]) Zu Versuchen betreffs der Gelbildung bei stark saurer Reaktion eignen sich die natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten selbstredend weniger. Ich werde solche Versuche hier denn auch nicht anführen, möchte nur bemerken, daß von einer genügenden Menge HCl (1,126 D.) oder HNO_3 (1,2 D.) in NaF-Plasma sofort Kuchenbildung eintritt.

stiegenen Fadenknäuelchen wurden mit einer Pinzette entfernt und in Aq. dest. übertragen. Nach der Auswaschung in mehrmals erneuertem Aq. dest. stellten die Knäuelchen jedes für sich eine kleine, mehr oder weniger elastische, reinweiße Faserstoffmasse dar[1]). Zwei dieser Fasermassen wurden zu der Weigertschen Fibrinfärbung verwendet und lieferten Präparate, in denen sich recht schön gefärbte Fädchennetze vorfanden[2]). Es war also im Fluornatriumplasma unter Säureeinfluß ein

[1]) Unter Umständen kann man einen Faserstoff bekommen, der mehr oder weniger weich ist und leicht auseinanderfällt, wenn man das Erzeugnis mittels zweier Pinzetten auszudehnen versucht. In solchen Fällen ist entweder etwas zu viel oder zu wenig Säure verwendet worden: der „neutrale" bzw. „isoelektrische" Punkt ist eben nicht scharf getroffen worden. (Ich hatte ja früher schon Gelegenheit, zu bemerken, daß Gelbildung in Fibrin-Alkalihydrosolen unter Säureeinfluß und in Fibrin-Säurehydrosolen unter Alkalieinfluß „um den neutralen Punkt herum" auftreten kann.) Es kann sich dabei auch ereignen, daß ein solches Erzeugnis, falls man es aus der Bildungsflüssigkeit in wenig Aq. dest. überträgt und dann schüttelt, auseinanderfällt, indem anfangs eine grobe Suspension gebildet wird. Überläßt man eine solche Suspension sich selbst bei Zimmertemperatur, so bleibt sie entweder nahezu unverändert, oder es entsteht eine feinere Suspension im Laufe von 24 bis 45 Stunden. Stellt man jedoch die ebengenannte grobe Suspension in den Brutschrank bei 37°, so bildet sich innerhalb einiger Stunden eine äußerst feine Suspension, bzw. opalescierende Flüssigkeit aus: das Gel bzw. Fibrin ist gewissermaßen in „Lösung" gegangen (man vergleiche hierzu auch den Versuch 4). Übrigens kann man, was ich vorher nicht erwähnt habe, dergleichen Erzeugnissen ebenfalls bei den unter Säureeinfluß in künstlichen Fibrin-Alkalihydrosolen und umgekehrt bei den unter Alkalieinfluß in künstlichen Fibrin-Säurehydrosolen gebildeten Gelen begegnen. Die Gele enthalten in solchen Fällen eben noch zu viel Säure bzw. Alkali adsorbiert, locker „gebunden", locker „verankert" wenn man will, infolgedessen lassen sie sich noch mehr oder weniger leicht in Aq. dest. verteilen bzw. „lösen". Solche Erzeugnisse machen also den Eindruck „löslicher Faserstoffe", sind also gewissermaßen zu vergleichen mit dem Denisschen „Fibrin concrète pure" oder besser mit dem von Hammarsten bei Gegenwart einer Spur Alkali in seinen „Fibrinogenlösungen" (sei es auch unter dem Einfluß von „Fibrinferment") erhaltenen „löslichen Fibrin". (Man vergleiche: Olof Hammarsten, Arch. f. d. ges. Physiol. **30**, 449, 453 bis 455, 1883.)

[2]) Die Faserstoffe müssen zu diesem Zwecke besonders lange und tüchtig gewaschen werden, um gute Weigert-Bilder liefern zu können. Und außerdem müssen zu diesem Zwecke die resistenten, einigermaßen elastischen Faserstoffe verwendet werden; von den in der Fußnote 1, S. 94

Faserstoff gebildet worden, dem in morphologischer und histologischer Hinsicht die Eigenschaften des Fibrins zugesprochen werden mußten. Auch bezüglich der Reversibilität verhielt dieser Faserstoff sich den früher erwähnten, z. B. dem unter Serumeinfluß entstandenen Faserstoffe, ähnlich, wie aus den fortgesetzten Versuchen hervorgeht. Es wurden nämlich die 8 übriggebiebenen Faserstoffmassen aus dem Aq. dest. sämtlich in 0,02 %ige NaOH-Lösung übertragen, in der sie sich recht bald zu einer klaren Flüssigkeit lösten. (In dieser Hinsicht besteht ein gewisser Unterschied gegen die unter Serumeinfluß in NaF-Plasma gebildeten Faserstoffe, insoweit nämlich, als letztere sich bedeutend langsamer von Alkali in derselben Konzentration lösen lassen.) Die Hälfte der erhaltenen Lösung wurde gekocht (Lösung B), die andere Hälfte (Lösung A) wurde ungekocht zu den folgenden Versuchen verwendet.

a) Zu je 4 ccm der Lösungen A und B wurde 0,1 %ige H_3PO_4 hinzugesetzt, bis Trübung entstand. Nach 15 Minuten war die Lösung A von einem äußerst zarten Fädchenwerk durchwebt; in der Lösung B war ebenfalls ein Gerinnsel vorhanden, das sich in den untersten Flüssigkeitsschichten fand und grob aussah. Bei der mikroskopischen Untersuchung ergab sich, daß dieses Gerinnsel zusammengesetzt war aus Fädchen und feinen länglichen, harncylinderähnlichen „Häutchen“[1]). Zwischen und auf den Fädchen und Häutchen fand sich außerdem hier und da eine körnige (von „amorphen“ Eiweißstoffen gebildete?) Masse, so daß einige Häutchen sogar etwas „granuliert“ aussahen.

---

erwähnten „weichen“ Erzeugnissen bekommt man weit weniger schöne Präparate. Übrigens sei bemerkt, daß das Material in der früher angegebenen Weise behandelt wurde, auch in diesen Fällen wurde während wenigstens 1½ Stunden in Anilinölxylol differenziert.

[1]) Solchen harncylinderähnlichen Gebilden bin ich öfters begegnet, nicht nur bei der Gelbildung in gekochten, sondern ebenfalls in ungekochten, natürlichen und künstlichen Fibrinalkalihydrosolen. Es will mir wahrscheinlich vorkommen, daß es sich hier um mehr als eine bloß morphologische Ähnlichkeit handelt: es dürfte nämlich meines Erachtens manchen echten Cylindern, wie sie bei akuter und chronischer Nephritis im Harn gefunden werden, ein äußerst dichtes verfilztes Fibrinfädchennetzwerk zugrunde liegen; die Bedingungen für die Entstehung von solchen „Fibrinhäutchen“ sind ja bei Nephritis vorhanden. Übrigens ist diese Vermutung sehr leicht der experimentellen Prüfung zugänglich.

b) Zu je 5 ccm der Lösung A und B wurden 2 ccm Serum hinzugefügt. Nach 15 Minuten in beiden Proben: Koagulum.

3. Zu 100 ccm formelementfreiem NaF-Plasma wurde unter Rühren 5%ige NaH_2PO_4-Lösung hinzugesetzt, bis um den neutralen Punkt herum starke Trübung entstand[1]). Nach 30 Min. war ein ausgiebiges Gerinnsel vorhanden, das mit einem Glasstabe entfernt und in Wasser übertragen wurde. Nach tüchtigem Auswaschen in mehrmals erneuertem Wasser stellte das Gerinnsel eine weiße, ziemlich elastische Faserstoffmasse dar. Ein Teil dieser Fasermasse wird in einer Klemme an die Luft gehängt und ist am nächsten Tage zu einem spröden, harten, fast durchsichtigen Stäbchen eingetrocknet, das, in Wasser zurückgebracht, wieder weiß (undurchsichtig) und elastisch wird[2]).

Der größte Teil der Fasermasse wurde in 0,05%ige H_3PO_4 übertragen, in der er sich bald löste.

Zu je 15 ccm letzterer Lösung wurden hinzugesetzt: a) 1%ige NaOH-Lösung, b) 5%ige Na_2HPO_4-Lösung, bis um den neutralen Punkt herum Trübung bzw. Niederschlag eintrat. Als dann die Proben nach 2 Stunden besichtigt wurden, fand sich in beiden die Flüssigkeit von Fädchennetzwerk durchwebt. Am nächsten Tage fand sich in der Probe a) das Fädchenwerk noch fast unverändert vor, während in der Probe b) das Netzwerk in der einen Hälfte der Flüssigkeitssäule (an der Röhrchenwand haftend) vorhanden war; in diesem Falle hatte also eine Retraktion des Fädchengerinnsels stattgefunden.

4. In eine größere Menge formelementfreien NaF-Plasmas wurde mittels verdünnter Orthophosphorsäure um den neutralen Punkt herum Gelbildung hervorgerufen. Die nach wieder-

---

[1]) Die Grenzen, zwischen denen in fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten und künstlichen Fibrinalkalihydrosolen bleibende Niederschlags- bzw. Gelbildung eintreten kann unter dem Einfluß von NaH_2PO_4 (dasselbe gilt für KH_2PO_4 und in noch stärkerem Maße für $CaH_4(PO_4)_2$) sind noch bedeutend weniger scharf als die, zwischen denen unter dem Einfluß freier Säuren Gelbildung eintritt.

[2]) Es ist eine auffallende Tatsache, daß die getrockneten reinen (bzw. reineren) Faserstoffe (dies gilt ebenfalls von dem früher erwähnten, im NaF-Plasma „spontan" gebildeten sowie von den in diesem Plasma oder in Transsudaten unter Serumeinfluß entstandenen Faserstoffen) nach Zurücklegung in Wasser bedeutend elastischer bzw. zäher sind, als sie vorher in frischem Zustande waren.

holtem Auswaschen in Wasser aus dem Gerinnsel erhaltene weiße Faserstoffmasse wurde in 0,05%ige NaOH-Lösung übertragen, in der sie sich bald löste. Zu dieser Lösung wurde 1%ige H_3PO_4 unter Rühren hinzugetropft, bis Trübung entstand. Nach 15 Min. hatte sich ein wenig ausgiebiges Fädchenwerk ausgebildet. Die Probe blieb stehen; am nächsten Morgen war das Fädchenwerk verschwunden, es lag nunmehr eine opalescierende Flüssigkeit vor. Die Reaktion der Flüssigkeit war Lackmus gegenüber sehr deutlich sauer. Es war in diesem Falle offenbar etwas zu viel Säure verwendet worden, wodurch merkwürdigerweise die anfängliche Bildung eines Fädchenwerks nicht verhindert worden war. Offenbar war dann nachher das geformte Gel wieder in ein ungeformtes zurückverwandelt, mit dem Erfolge, daß eine äußerst feine Suspension entstanden war. Es wurden nun letzterer feinen Suspension einige Tropfen 0,1%iger NaOH-Lösung hinzugesetzt, wodurch sich die Opalescenz zu einer Trübung bzw. Präcipitat verstärkte. Die Reaktion war nunmehr Lackmuspapier gegenüber amphoter. Und abermals merkwürdigerweise (später fand ich solche Ergebnisse sozusagen selbstverständlich) hatte sich das Präcipitat innerhalb 1 Stunde in ein schönes Fädchenwerk verwandelt, das am nächsten Tage noch unverändert vorhanden war. Es geht also aus solchen Versuchen die Möglichkeit hervor, die geformten Gele in ungeformte und geformte zurückzuverwandeln, es handelt sich hier einfach um ein Spiel der Säure- und Alkaliwirkung um den neutralen Punkt herum. Innerhalb gewisser Grenzen[1]), „um den neutralen Punkt herum", bildet sich eben ein geformtes Gel aus, d. h. die „ausgeflockten" Kolloidteilchen agglutinieren zu Fädchen. Werden diese Grenzen, es sei nach der Alkali- oder nach der Säureseite hin, um ein wenig zu viel überschritten, so bildet sich eine Suspension aus. Werden die Grenzen noch weiter überschritten, so entsteht eben ein Sol (Alkali- oder Säurehydrosol). Der Frage betreffs der möglichen Vorgänge bei solchen Prozessen werde ich bei einer späteren Gelegenheit näherzutreten versuchen.

[1]) Selbstverständlich wäre es erwünscht, solche Grenze genauer zu bestimmen zu versuchen, was ich bis jetzt äußerer Umstände wegen nicht getan habe.

5. Mit Salzsäure, Salpetersäure, Essigsäure, Metaphosphorsäure (mit anderen freien Säuren habe ich in dieser Hinsicht keine Versuche gemacht) sowie mit KH_2PO_4 und $CaH_4(PO_4)_2$ wurden Fluornatriumplasma gegenüber ganz ähnliche Resultate erhalten wie in den Versuchen 1 bis 4. Um nicht in Wiederholungen zu verfallen, werde ich davon Abstand nehmen, von allen diesen Versuchen hier Beispiele anzuführen. Nur möchte ich noch hinzufügen, daß auch unter dem Einfluß von CO_2 im Fluornatriumplasma Gelbildung in Fädchenform herbeigeführt werden konnte, wenn man zu diesem Plasma mit CO_2 gesättigtes Wasser in nicht zu geringer Menge hinzusetzte. Von letzteren Versuchen sei es gestattet, hier ein Beispiel vorzubringen.

a) Zu 10 ccm NaF-Plasma wurden 20 ccm mit CO_2 gesättigtes Wasser hinzugefügt.

b) Zu 10 ccm NaF-Plasma wurden zur Kontrolle 20 ccm Aqua dest. hinzugesetzt.

Nach $^1/_4$ Stunde war in a) eine Trübung entstanden, in b) war nichts von einer Trübung zu sehen, auch nicht bei Seitenbeleuchtung gegen Gasglühlicht.

Nach 1 Stunde war in a) ein äußerst zartes Fädchenwerk zu erkennen, b) war unverändert. (Nach 24 Stunden fand sich jedoch in b) ein zartes Fädchengerinnsel.)

Indem die Probe a) nunmehr geschüttelt wurde, verwandelte sich das zarte Fädchenwerk in Flocken, bei dem bei der mikroskopischen Untersuchung ein Fädchennetzwerk nachzuweisen war.

B. Versuchsbeispiele betreffend die reversible Gelbildung in Transsudaten unter Säureeinfluß.

Bemerkt sei, daß sämtliche zu erwähnenden Versuche angestellt worden sind mit Transsudaten, die innerhalb 2 Stunden nach der Punktion in Angriff genommen worden waren. Es hatte sich nämlich herausgestellt, daß mehrere bis 24 Stunden aufbewahrte Transsudate sich zu meinen Versuchen nicht oder weniger gut eigneten, und zwar weil in Ascitesflüssigkeiten (und dasselbe gilt für Hydroceleflüssigkeit) merkwürdigerweise nach dieser Zeit keine oder kaum Gelbildung mehr zu erhalten war.

1. Drei Reagensgläschen wurden ausgespült resp. mit a) verdünnter Orthophosphorsäure, b) verdünnter Salzsäure, c) ver-

dünnter Essigsäure, so daß die Röhrenwände mit Säure benetzt worden waren, während sich am Boden ein paar Säuretropfen sammelten. Sodann wurde mittels einer Pipette in jedes Rohr so viel Ascitesflüssigkeit hineingebracht, bis (bei Seitenbeleuchtung gegen Gasglühlicht) Trübung wahrnehmbar wurde. Nach 15 Minuten war in a), b) und c) ein Fädchenwerk vorhanden („Membranform"). Die Proben blieben stehen: nach 24 Stunden war in allen drei Proben das Gerinnsel verschwunden!

2. Die Proben a), b) und c) wurden in der folgenden Weise wiederholt. Nach der Bildung des Fädchenwerks wurde geschüttelt. Es verwandelte sich dabei in jedem Rohre das Fädchenwerk in ein Fadenklümpchen, das zur Oberfläche der Flüssigkeit stieg. Die Fadenklümpchen wurden entfernt und jedes für sich in Aq. dest. übertragen, in dem sie stehen blieben. Nach 24 Stunden waren die Gerinnsel auch nun wieder verschwunden.

3. Die Versuche a), b) und c) wurden nochmals wiederholt und erweitert. Die nach der Bildung des Fädchenwerks durch Schütteln erhaltenen Fadenknäuelchen wurden in Aq. dest. übertragen und dann schnell in mehrmals erneuertem Aq. dest. gewaschen unter Zuhilfenahme des Zentrifugierens. Die weichen Fäserchen lösten sich dabei nicht, hatten allerdings ihren Zusammenhang teilweise verloren, so daß sie sich jeweils nur durch Zentrifugieren sammeln ließen.

Die Fäserchenmassen a), b) und c) wurden sodann jede für sich in 0,01 %ige NaOH-Lösung übertragen, in der sie sich bald lösten (Lösung a), b), c).

Zu 3 ccm der Lösung a) wurde 1 ccm Serum hinzugefügt. Nach 15 Minuten kleines Koagulum. Das Koagulum wurde in mehrmals erneuertem Aq. dest. gewaschen, die in dieser Weise erhaltene Fäserchenmasse wurde dann in 0,01 %ige NaOH-Lösung übertragen. Nach 1 Stunde Lösung. Zu dem (leicht opalescierenden) Filtrat hinzugesetzt: Serum. Sofort Koagulum. Zu der Lösung b) wurde verdünnte HNO_3 und zu der Lösung c) verdünnte HCl hinzugesetzt, bis Trübung entstand. Nach 15 Minuten in b) und c): Fädchennetzwerk.

4. Zu je 10 ccm Ascitesflüssigkeit wurden je 20 ccm mit CO_2 gesättigtem Aq. dest. hinzugefügt. Schon nach einigen Minuten war Trübung, nach 1 Stunde ein Fädchenwerk ent-

standen. Beide Proben wurden nunmehr vorsichtig geschüttelt, das Fädchenwerk geht dabei nicht in Flocken, sondern in ein Fadenknäuelchen über. Die Fadenknäuelchen a) und b) aus beiden Proben wurden in Aq. dest. übertragen. a) wurde in dem Aq. dest. sich selbst überlassen und war nach 24 Stunden verschwunden; b) wurde schnell in mehrmals erneuertem Wasser gewaschen, während die durch Zentrifugieren gesammelte Fäserchenmasse dann in 0,01 %ige NaOH-Lösung übertragen wurde. Schnelle Lösung. Zu 3 ccm der letzteren Lösung wurden 6 ccm mit CO_2 gesättigtem Aq. dest. hinzugesetzt. Trübung nach 5 Minuten, nach $^1/_2$ Stunde Flocken.

5. Zu 200 ccm Ascitesflüssigkeit wurden 200 ccm Syphonwasser (d. h. also mit CO_2 übersättigtes Wasser) hineingespritzt. Es trat dabei Schaumbildung ein. Der Schaum, der sich nach einiger Zeit an der Oberfläche der Flüssigkeit angesammelt hatte, wurde abgeschöpft und in Aq. dest. übertragen. Es schwebten nunmehr in dem Wasser zahlreiche Flocken und kurze Fädchen. Die Flocken waren, wie die mikroskopische Untersuchung lehrte, aus einem Netzwerk feinerer und gröberer Fädchen zusammengesetzt, in dem zahlreiche Gasbläschen sich eingeschlossen fanden. Nun wurde zentrifugiert, die Flocken und Fädchen setzten sich dabei teilweise an den Boden, teilweise an den Wänden der Zentrifugenröhren ab, während eine mehr weniger zusammenhängende Flockenmasse sich an der Flüssigkeitsoberfläche fand. Letztere Masse konnte mittels eines Glasstabes gegen die Wand der Zentrifugenröhren gedrückt werden, so daß sich das Wasser abgießen ließ. Die Flocken, die am Boden und an der Wand der Röhren hafteten, blieben dabei an den Stellen, wo sie sich fanden, klebten also offenbar an der Glaswand. Nunmehr wurde in die Zentrifugenröhren ein wenig einer 0,01 %igen NaOH-Lösung hineingebracht, während die Flocken mit einem Glasstabe in die Flüssigkeit gestoßen wurden, soweit sie sich nicht schon in der Flüssigkeit fanden. Dann wurde die Flockenflüssigkeitsmasse aus den verschiedenen Röhren zusammengegossen. Nach 25 Minten war bereits Lösung (mit Opalescenz) eingetreten. Zu 20 ccm dieser (konzentrierten) Lösung wurden 20 ccm mit CO_2 gesättigtem Aq. dest. (kein Syphonwasser also) hinzugegeben, mit dem Erfolge, daß nach 10 Minuten Trübung und nach 2 Stunden ein äußerst

zartes weitmaschiges Fädchenwerk (die Probe wurde in einem kleinen Becherglase vorgenommen) in der Flüssigkeit konstatiert wurde.

Schlußfolgerungen.

Während die Gelbildung in natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten unter dem Einfluß von Alkali (bzw. einem Zuviel an Alkali) verzögert bzw. gehemmt wird, kann im Gegenteil in diesen Flüssigkeiten unter geeigneten Umständen Gelbildung hervorgerufen werden unter dem Einfluß von verdünnten Säuren und sauren Salzen, und zwar um den neutralen Punkt herum.

Die natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten verhalten sich also Alkalien, Säuren und sauren Salzen gegenüber wie künstliche Fibrin-Alkalihydrosole; in den natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten (Transsudaten, Plasma, Blut) ist eben ein gerinnbarer kolloider Eiweißstoff im Alkalihydrosolzustande vorhanden. Die Gele bzw. Gerinnsel, die unter dem Einfluß von Säuren oder sauren Salzen in natürlicher fibrinogenhaltiger Flüssigkeit erhalten werden können, stimmen in ihren Eigenschaften im Prinzip überein einerseits mit den Gelen bzw. Gerinnseln, die unter denselben Bedingungen in künstlichen Fibrin-Alkalihydrosolen hervorgerufen werden können, und andererseits mit den Gelen bzw. Gerinnseln, die unter gewissen Umständen anscheinend „spontan“ in natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten entstehen, und ebenfalls mit solchen Gelen bzw. Gerinnseln, die unter Serumeinfluß in natürlichen fibrinogenhaltigen Flüssigkeiten oder künstlichen Fibrin-Alkalihydrosolen hervorgebracht werden können.

Die besagte Übereinstimmung zwischen den genannten Gelen bezieht sich nicht nur auf morphologische und histologische Kennzeichen, sondern ebenfalls auf die Reversibilität der Gele. Sämtliche Gele lassen sich nämlich in sehr verdünnten Alkalien und Säuren wieder lösen (wenn auch in ungleich leichter

Weise, ein Umstand, auf den ich nachher zurückzukommen haben werde), während in solchen Alkali- bzw. Säurehydrosolen aufs neue reversible Gelbildung hervorgerufen werden kann. Es dürfte sich eben in sämtlichen Fällen um ein und denselben Eiweißstoff handeln, der nach Belieben unter Säure- und Alkalieinfluß aus einem Sol- in den Gelzustand und umgekehrt übergeführt werden kann, während diesem Eiweißstoff die merkwürdige Eigenschaft zukommt, in Fädchenform agglutinieren zu können, wenn er in irgendeiner Weise[1]) aus seinem Säure- oder Alkalihydrosolzustande „ausgeflockt" wird.

[1]) Auch unter Salzeinfluß, wie in einer späteren Mitteilung dargetan werden wird.

Beiträge zur Chemie der proteolytischen Fermente.

Vorläufige Mitteilung.

Von

E. Herzfeld.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Medizinischen Universitätsklinik in Zürich.)

(Eingegangen am 5. Mai 1914.)

Im Anschluß an die Versuche mit dem Abderhaldenschen Dialysierverfahren hat Verfasser Beobachtungen machen können, die ihn zu den weiteren, unten geschilderten Untersuchungen veranlaßten. Die schon von anderen Autoren erwähnte Tatsache, daß auch inaktivierte Blutsera eine abbauende Fähigkeit besitzen, konnte wiederholt bestätigt werden. Besonders auffallend war aber, daß alle diejenigen Sera, die stark abbauende Wirkung hatten, gegenüber anderen eine größere Menge dialysierbarer, mit Triketohydrindenhydrat reagierende Stoffe enthielten. Es war also der Gedanke naheliegend, daß diese Stoffe bei der Proteolyse eine Rolle spielen können. Um dieser Frage näher zu kommen, hat Verfasser eine Reihe verschieden wirkender Pepsinpräparate einerseits und Trypsinpräparate andererseits in dieser Richtung untersucht, um festzustellen, ob auch bei den isolierten Fermenten zwischen der Wirksamkeit und der Menge der dialysierbaren, mit Triketohydrindenhydrat reagierenden Stoffen ein derartiger Zusammenhang zu finden ist.

Zunächst wurden eine Anzahl Pepsin- und Trypsinpräparate auf ihre Wirksamkeit geprüft und dementsprechend klassifiziert. Dann folgte die Ausführung von Stickstoffbestimmungen, bei denen es sich zeigte, daß das wirksamste Fermentpräparat den höchsten, das minderwertigste den niedrigsten Stickstoffgehalt hatte. Ebenso konnte beim Dialysieren der Fermentpräparate gefunden werden, daß das wirksamste Präparat die größte Menge der mit Triketohydrindenhydrat reagierenden Stoffe enthielt, dagegen das minderwertigste die kleinste Menge solcher Verbindungen.

Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, daß die Pepsine und Trypsine Eiweißderivate sein können. Es ergab sich ferner, daß alle Pepsinpräparate mehr oder weniger starke Biuretreaktion gaben, dagegen fiel diese besonders bei den wirksamen Trypsinen stets negativ aus. Außerdem konnten auch bezüglich Stickstoffgehalt und Menge der dialysierbaren, mit Triketohydrindenhydrat reagierenden Stoffe die Pepsine am besten mit Peptonen, die Trypsine aber mit Aminosäuren oder deren Derivaten verglichen werden.

Um dieser Auffassung eine sichere Grundlage zu schaffen, sollte die proteolytische Wirkung des Pepsins mit der der Peptone und die des Trypsins mit der Wirkung von Aminosäuren verglichen werden. Diese Proteolysen wurden mit zahlreichen Kontrollen in Dialysierhülsen (jeder Versuch in drei verschiedenen Hülsen) ausgeführt und mit der vom Verfasser ausgearbeiteten, quantitativen Triketohydrindenhydratmethode gemessen.

Es mögen die bisherigen Ergebnisse wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Beim Dialysieren einer bestimmten Menge von wässerigem Pepsin erhält man eine bestimmte Menge mit Ninhydrin reagierender Stoffe, dagegen dieselbe Pepsinmenge in 0,18% HCl gelöst und dialysiert gibt weniger von solchen Verbindungen. Dasselbe findet man bei der derartigen Untersuchung von Pepton. Die abbauende Wirkung des Pepsins in wässeriger und in 0,18%iger HCl-Lösung ist fast gleich stark. Aber auch eine Peptonlösung baut in Wasser und in 0,18% HCl ähnliche Mengen von Eiweiß ab, vorausgesetzt, daß das Pepton aus einem ebensolchen Eiweißkörper stammt. Also wird Albumin mit einem Pepton aus Albumin, aber nicht durch Seidenpepton abgebaut.

2. Eine bestimmte Menge Trypsin, in Wasser gelöst, gibt beim Dialysieren eine bestimmte Menge mit Ninhydrin reagierender Stoffe. Dieselbe Trypsinmenge, in 0,5% $NaHCO_3$ oder in 0,5% Na_2CO_3 dialysiert, gibt weniger von obigen Verbindungen. Das Trypsin vermag schon in Wasser einen beträchtlichen Teil vom Eiweiß abzubauen, in 0,5%iger $NaHCO_3$- oder in 0,5%iger Na_2CO_3-Lösung davon mehr; in demselben Verhältnis wirken auch die Aminosäuren auf Eiweiß. Bisher konnte für die Aminosäuren keine solche Spezifität wie für die Peptone

konstatiert werden; die diesbezüglichen Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

3. Aus obigen Resultaten kann gefolgert werden, daß in den Pepsinen, wenn auch nicht ausschließlich, jedoch hauptsächlich Gemische von Peptonen und in den Trypsinen Gemische von Aminosäuren die wirksamen Bestandteile bilden. Da das Pepsin eine große Anzahl Eiweißkörper abbauen kann, ist anzunehmen, daß darin auch die diesen Eiweißkörpern entsprechenden Peptone vorhanden sind. Es kann also aus diesem Grunde dem Pepsin keine spezifisch abbauende Wirkung gegenüber einzelnen Eiweißkörpern zugeschrieben werden. Ebenso wird es sich auch wohl mit dem Trypsin verhalten.

4. Auch der Fermentcharakter, daß auch Spuren davon noch eine Wirkung entfalten, konnte für Peptone und Aminosäuren durch vergleichende Versuche erwiesen werden. 1 mg Pepsin oder Trypsin baute aus 100 mg Eiweiß eine bestimmte Menge ab, eine ähnliche Menge konnte auch 1 mg des dem Eiweiß entsprechenden Peptons oder der Aminosäuren abbauen.

5. Die proteolytischen Fermente, namentlich die Pepsine und Trypsine, erscheinen also als typische Katalysatoren, welche die langsam verlaufenden Eiweißhydrolysen beschleunigen und bis zu jenem Stadium führen, in dem sie sich selber befinden. So spalten die Peptone (Pepsin) die Eiweißkörper in Peptone, die Aminosäuren (Trypsin) aber diese in Aminosäuren. Wenn nun die Annahme, daß in den wirksamen Pepsin- und Trypsinpräparaten die proteolytische Wirkung den Peptonen und Aminosäuren zukommt, berechtigt ist, so liegt keine Veranlassung mehr vor, diese Stoffe als Fermente zu bezeichnen.

6. Verfasser hat auch einige Anhaltspunkte dafür, daß in einigen kohlenhydratspaltenden Fermenten auch ein entsprechendes Abbauprodukt der wirksame Teil ist. Sollte dies auch noch für andere Fermente nachweisbar sein, so könnte man im allgemeinen die Fermente als Abbauprodukte ansehen, die unter günstigen physikalischen und chemischen Bedingungen den Abbau der entsprechenden Körper beschleunigen und bis zu jenem Stadium führen, in dem sie sich selbst befinden.

Zur Frage nach den Zerrüttungen des Knochensystems durch phosphorarme Ernährung.

III. Mitteilung.

Von

M. Masslow.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Instituts für experimentelle Medizin und der Klinik für Kinderkrankheiten der Kaiserlichen Militärmedizinischen Akademie in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 6. Mai 1914.)

Im vorigen Jahre wurden in dieser Zeitschrift zwei Arbeiten von mir veröffentlicht, die der Frage über das experimentelle Studium des Einflusses des Phosphors und seiner Verbindungen auf die Entwicklung des Organismus und auf die intracellulären Fermente gewidmet waren, und die die Frage zu lösen versuchten, ob der tierische Organismus imstande ist, komplizierte phosphorhaltige Verbindungen aus phosphorfreien Eiweißen und Phosphaten zu synthesieren. Die vorliegende Mitteilung erscheint als Ergänzung zu den genannten Arbeiten und ist den Veränderungen im Knochensystem gewidmet. Tatsache ist, daß ich außer genannten Fragen auch diese Frage lösen wollte, und deshalb bewahrte ich die Knochen der Versuchs- und Kontrolltiere für die mikroskopische Untersuchung auf. Anfangs wollte ich alle mikroskopischen Erscheinungen sehr ausführlich beschreiben, aber während dieser Zeit erschien im Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. eine derselben Frage gewidmete ausführliche

---

[1]) M. Masslow, Über die biologische Bedeutung des Phosphors für den wachsenden Organismus. Diese Zeitschr. **55** und **56**, I. und II. Mitteilung, 1913.

Arbeit Prof. Schmorls[1]). Der Autor untersuchte auch die Knochen der Hunde, die eine phosphorarme Diät erhalten hatten. Zuerst waren diese Versuche von Lipschütz[2]) gemacht worden, und später wurden diese Versuche speziell für Schmorl in Heubners Laboratorium wiederholt, um eine größere Menge von Knochen untersuchen und zugleich die Versuche von Lipschütz kontrollieren zu können. Das Resultat der Untersuchungen erscheint in beiden Fällen analog. Sehr genaue Beschreibungen aller Veränderungen im Knochensystem, die Schätzung derselben vom Standpunkt der phosphorarmen Ernährung aus bilden den Inhalt dieses Artikels. Die Versuchsbedingungen waren bei Lipschütz und Schmorl ungefähr dieselben wie bei meinen Versuchen und verfolgten denselben Zweck. Deshalb wurde meine Aufgabe nach dem Erscheinen von Schmorls Artikel einfacher. An der Hand der ausführlichen Beschreibungen konnte ich leicht alle meine Beobachtungen prüfen und vergleichen und die Schlüsse ziehen. Ich halte es nicht für überflüssig, meine Beobachtungen zu veröffentlichen, da sie noch einmal die Tatsache bestätigen, daß bei den angewandten Versuchsbedingungen sich in dem Knochensystem ganz spezifische Veränderungen zeigen.

Von den Versuchsbedingungen werde ich nicht sprechen, da sie in meinen früheren Arbeiten[3]) genau beschrieben sind. Hier erwähne ich nur, daß ich für die mikroskopischen Untersuchungen sowohl die Knochen von 2 normalen Kontrolltieren nahm als auch die von 3 Tieren, die phosphorarme Nahrung erhielten. Es wurden von mir Humerus, Femur, Tibia und Rippen genommen, decalciniert und mit Celloidin begossen. Leider verdarben die Knochen der Tiere, die Phosphate und Glycerophospate erhalten hatten, darum kann ich nur von den Knochen der Tiere sprechen, die phosphorarme Nahrung bekommen hatten. Bei der Beschreibung von meinen Präparaten beschränke ich mich nur auf sehr kurze Bemerkungen, da meine

---

[1]) Schmorl, Über die Beeinflussung des Knochenwachstums durch phosphorarme Ernährung. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 73, 313, 1913.

[2]) Lipschütz, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 62, 1910.

[3]) Siehe meine Arbeit in dieser Zeitschr. 55 und 56, 1913; auch meine Dissertation St. Petersburg 1913.

Beobachtungen nach der Arbeit von Schmorl nur als Ergänzung erscheinen und die ausführliche Schilderung eine Wiederholung seiner Beschreibung wäre. Zunächst muß ich sagen, daß die Veränderungen in den Knochen bei allen Tieren ungefähr gleich ausgeprägt waren, obgleich die Tiere zu sehr verschiedenen Zeiten lebten. Vergleicht man sie mit normalen Knochen, so zeigen sich die Unterschiede. Bei einem allgemeinen Überblick über diese Veränderungen in den Knochen muß ich hervorheben, daß sie vor allem in verminderter Bildung der Knochensubstanz, im Abschwächen der Tätigkeit der Osteoblasten bestanden. Wir beobachten hauptsächlich die Reduktion der Spongiosa, das Verschwinden der Knochenbälkchen, besonders an der Knorpelgrenze, ihre unregelmäßige Verteilung, ihre unnatürliche, dünne Gestalt. Das lymphoide Knochenmark verschwindet und an seiner Stelle finden wir Mark, sehr arm an Zellen, das in stärkerem oder geringerem Grade dem Gerüstmark bei der Barlowschen Krankheit ähnelt. Die Knorpelwucherungszone ist verbreitet und unregelmäßig, die Einschmelzung seitens der Markgefäße geschieht ungleich. Der Inhalt der Gefäße in der Subchondralzone ist sehr mäßig, und an einigen Stellen fehlen dieselben vollkommen, auch liegen sie in den Knorpeln nicht gleich tief und so regelmäßig verteilt wie in normalen Fällen.

Die präparatorische Verkalkungszone zeigt auch sehr bedeutende Abweichungen. Sie fehlt entweder ganz oder liegt innerhalb der Wucherungszone in Form von ein oder zwei engen, unterbrochenen Schichten. Die Tätigkeit der Knorpelzellen wurde nicht geschädigt. Die Proliferationsschicht ist durchweg gut erhalten, besonders auf den schnellwachsenden Knochen. Aber die Einschmelzung geht unnatürlich vor sich, und an einigen Stellen, z. B. in den Rippen, tritt sie ganz und gar nicht hervor, und auch dort, wo eine Einschmelzung des Knorpels stattfand, sehen wir keine Bildung der Knochensubstanz bei dem gebildeten Pfeiler der verkalkten Knorpelsubstanz. Wir finden Spongiose als ein Gitterwerk aus verkalkten Knorpeln. Ich konnte keine großen Blutungen konstatieren, nur an einigen Stellen nahm ich kleine Blutaustritte wahr, und auf einigen Rippen konnte man Blutpigment finden; unter dem Periost waren keine Blutungen. Auf die aus-

führliche Beschreibung der einzelnen Knochen werde ich nicht eingehen; dies wäre nur eine Wiederholung der Beschreibung Schmorls, da meine Präparate dasselbe Bild aufweisen.

An der Hand der gewonnenen Tatsachen kann ich, wie auch Schmorl, zu dem Schlusse kommen, daß alle beobachteten Veränderungen in den Knochen an einigen Stellen das Bild der geheilten Rachitis ergaben, aber daß das ganze Bild am ehesten an die Erscheinungen der Barlowschen Krankheit erinnert. Aber es ist unmöglich, diese Krankheit mit den beobachteten Erscheinungen vollkommen zu identifizieren. Der Hauptunterschied besteht darin, daß es bei der Barlowschen Krankeit stark ausgeprägte Blutungen gibt, in Schmorls und unseren Fällen fehlen letztere vollkommen. Aber man kann hier hinzufügen, daß die experimentelle Barlowsche Krankheit bei einigen Tieren ohne Blutungen verlaufen kann. [Siehe die Beispiele aus der Monographie von Hart und Lessing[1]).]

Was die Frage bezüglich der Rolle des Phosphors in der Entwicklung dieser Erscheinungen betrifft, so muß ich hervorheben, daß alle meine Beobachtungen von der chemischen Untersuchung des Knochenmarks und aller Organe auf ihren Gehalt an Phosphor hin begleitet waren; und deshalb konnte ich den starken Mangel an Phosphor in allen Organen und im Knochensystem nachweisen. Die Vermutung also, daß hauptsächlich der Phosphormangel der Grund aller dieser Erscheinungen war, drängt sich von selbst auf. Die Knochen und Organe enthalten sehr große Mengen Phosphor, und es wäre zu unnatürlich, zu vermuten, daß er ungestraft entzogen werden könnte. Es ist wohl möglich, daß beim Tode der Tiere auch der Mangel anderer Stoffe eine Rolle spielte, aber niemals darf man dem Phosphor seine sehr wichtige Bedeutung absprechen. Was die Frage nach der Rolle der Vitamine oder Oryzanine betrifft, so muß ich sagen, daß ich mich damit speziell nicht beschäftigte und ihre zukommende mögliche Bedeutung nicht verneinen kann; aber es wäre unrichtig, alle Erscheinungen ihnen zuzuschreiben und vom Phosphor zu abstrahieren. Außerdem bleibt die Frage nach Existenz der Vitamine (Funk) und Oryzanine (Susuki) und nach ihrer Bedeutung noch offen,

[1]) C. Hart und O. Lessing, Der Skorbut der kleinen Kinder. 1913.

harrt noch der Bestätigung und darf nicht verallgemeinert werden. Auch kommen Abderhalden und A. Lampé[1]) auf Grund ihrer Versuche zu dem Schluß, daß „zurzeit kein zwingender Beweis für die Annahme bisher gänzlich unbekannter, lebenswichtiger Substanzen von ganz allgemeiner Bedeutung vorliegt". In Anbetracht dessen ist man zu der Behauptung berechtigt, daß in der Pathogenesis der Zerstörungen im Knochensystem der Phosphor eine bestimmte Rolle spielt.

---

[1]) Abderhalden und Lampé, Gibt es lebenswichtige, bisher unbekannte Nahrungsstoffe? Zeitschr. f. d. ges. experim. Med. 1913, I, S. 296.

Über Pflanzenenzyme.

I. Die Oxydasen des Maiskolbens.[1])

Von

G. Doby.

(Aus der Kgl. ungarischen landwirtschaftlich-chemischen Versuchsstation in Magyaróvár.)

(Eingegangen am 6. Mai 1914.)

Die an Pflanzenteilen auftretenden dunklen Verfärbungen können sehr oft auf die Wirkung von oxydierenden Enzymen zurückgeführt werden[2]); besonders die Tyrosinase übt öfters ähnliche Wirkungen aus. Am allbekanntesten ist diese Erscheinung an zerkleinerten Rüben und Kartoffeln.

Eine ähnliche Verfärbung kann man an den Griffeln der weiblichen Blüten des Maises, des sog. Maiskolbens, beobachten; diese Griffel verfärben sich in dem Maße, wie sie nach der Befruchtung von ihrem freien Ende an verwelken, nach und nach von tiefbraun bis schwarz. Es schien mir wahrscheinlich, insbesondere nach dem Farbenton geurteilt, daß diese Verfärbung durch Oxydasen, vielleicht eben durch Tyrosinase verursacht wird. Und nachdem es Wolfg. Ostwald[3]) gelang, eine Anreicherung der Oxydasen bei der Befruchtung tierischer Eier festzustellen, schien es nicht unmöglich, auch bei den Griffeln des Maiskolbens einen ähnlichen Zusammenhang zu finden. Diese Versuchsobjekte sind für derartige Versuche besonders

---

[1]) Vorgetragen in der Sitzung der Ungarischen Akad. d. Wissensch. (mathem.-naturw. Klasse) vom 22. Januar 1912.

[2]) Von eingehenderen Arbeiten wären hier zu erwähnen die klassischen Untersuchungen Bourquelots über die oxydierenden Enzyme der Pilze, dann Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 125, 378, 389, 1908; 27, 101, 1909 usw.

[3]) Wolfg. Ostwald, diese Zeitschr. 6, 409, 1907.

geeignet, da sie wegen ihrer Größe leicht in genügender Menge zu sammeln sind.

In dieser Arbeit, deren Versuche ich im Sommer 1911 ausführte, aber infolge verschiedener Behinderungen erst jetzt dazukam, sie in deutscher Sprache zu veröffentlichen, soll vor allem gezeigt werden, daß die Griffel des Maiskolbens durch die Wirkung von Peroxydase und Oxygenase verfärbt werden, Tyrosinase jedoch nicht enthalten. Außerdem wurden die Versuche in zweierlei Richtungen geleitet: 1. reinigte ich soweit als möglich die Peroxydase der Griffel und des Kolbens und untersuchte — soweit es die geringen erhaltenen Mengen ermöglichten — ihre Eigenschaften, 2. trachtete ich, die quantitativen Schwankungen des Enzymsystems[1]) der Peroxydase in den frischen Griffeln bzw. Kolben zu bestimmen, und zwar sowohl in den natürlich befruchteten wie in den künstlich unbefruchtet erhaltenen Objekten.

Die aus den Griffeln sowie aus den Kolben dargestellten Peroxydasepräparate besaßen die für diese Enzyme charakteristischen Eigenschaften und hatten ein kochbeständiges Zymogen. Nach ihren qualitativen Reaktionen erwiesen sie sich nicht als Proteine, sondern als wasserlösliche, nicht reduzierende Polysaccharide. Es gelang mir leider nicht, den Aschegehalt der Präparate in wünschenswertem Maße herabzudrücken; das reinste Präparat aus den Griffeln enthielt noch 7,8 %, jenes der Kolben 5,3 % Asche[2]), in der ich Mangan nicht nachzuweisen vermochte, die Eisenreaktion war jedoch in verschiedener Stärke stets vorhanden.

Auffallenderweise waren diese Präparate gegen Wasserstoffsuperoxyd ziemlich empfindlich; dieser Umstand verursachte dann, daß die Wirkung des Enzyms nur bei den untersten Konzentrationen ein gerades Verhältnis mit der Konzentration des Enzyms aufwies, denn die Menge des Wasserstoffsuperoxyds wurde immer im Verhältnis des Aktivierungsvermögens[3]) bemessen und wirkte daher in den oberen Konzentrationen schon schädlich.

---

[1]) Euler und Bolin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 280, 1910/11.

[2]) Ein nichtdialysiertes Präparat de Stöcklins (Contrib. à l'étude de la peroxydase, Genéve 1907, S. 24) enthielt 22 %, ein anderes von Bach (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 365, 1910) 8 % usw.

[3]) Bach, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 3785, 1904.

In der verhältnismäßig in größerer Menge dargestellten Peroxydase der Griffel vermochte ich von den häufigeren Enzymreaktionen nur eine sehr schwache Katalasereaktion zu finden und kann daher dieses Präparat als enzymologisch ziemlich rein betrachtet werden.

Einige Vorversuche überzeugten mich davon, daß das Vorhandensein von Zuckern und Kohlenhydraten die Peroxydase in ihrer Wirkung zu stören vermag. Da man Oxydasen im allgemeinen in dieser Richtung noch nicht untersuchte, wirft dieser Befund ein interessantes Licht auf diese, eben bei der Atmung beteiligten Enzyme, zumal Verfasser in anderen Versuchen[1]) ein entgegengesetztes Verhältnis im Gehalt an Stärke und in der Konzentration der Oxydasen der Kartoffelknolle fand[2]).

In den Versuchen, die den Zweck hatten, eine etwaige Aufklärung über die physiologische Rolle dieser Peroxydasen und Oxygenasen zu schaffen, wurde vor allem bewiesen, daß die Oxygenase in den Griffeln stets vorhanden ist, wogegen sie in den Fruchtknoten und der Blütenstandachse nie zu finden war. Ich möchte diesen Befund als einen in biologischer Hinsicht wichtigen Umstand hervorheben, da er darauf hinweist, daß die Wirkung der vollständigen Oxydase zu den in den Griffeln sich abspielenden Vorgängen und vielleicht auch zum Wachsen des Pollenschlauches unentbehrlich ist, wogegen die Peroxydase in den Fruchtknoten und in der Hauptachse sozusagen nur ein Reserveenzym vorstellen kann, da dieselbe ja ohne Oxygenase keine Wirkung auszuüben imstande ist. Hierauf weist auch noch die Tatsache hin, daß sich die Fruchtknoten und die Hauptachse, in frischem Zustande zerkleinert, nie dunkel färben, während die Griffel unter solchen Umständen innerhalb weniger Minuten eine tiefbraune bis schwarze Färbung annehmen.

Die Unterschiede zwischen Griffeln und Kolben gehen aber noch weiter, denn auch das Verhalten ihrer Peroxydase im Laufe ihrer Entwicklung ist verschieden. Die Menge dieses

[1]) Doby, Biochemische Untersuchungen über die Blattrollkrankheit der Kartoffel, IV. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 22, 401, 1912.

[2]) Eine hemmende Wirkung von reduzierenden Substanzen auf Peroxydase fand neuerdings Atkins, Centralbl. f. Biochem. 15, 1913.

Enzyms blieb nämlich in den Fruchtknoten im untersuchten Zeitraum beinahe völlig unverändert und wuchs höchstens gegen das Ende unwesentlich an, als sich im Kolben schon eine beträchtliche Menge Reservenahrung ansammelte und die Trockensubstanz im allgemeinen stark zunahm. Noch gleichmäßiger bleibt die Menge der Peroxydase in der Hauptachse, obgleich sich dieselbe inzwischen wesentlich verändert, und zwar besonders stark verholzt.

Dagegen nimmt die Peroxydase in den Griffeln an Menge stark zu, so daß sie z. B. im letzten beobachteten Stadium der Entwicklung den 4 fachen Wert des anfänglichen erreichte; noch stärker war die Zunahme in den künstlich unbefruchtet erhaltenen Griffeln, wie dies aus folgender Zusammenstellung erhellt:

Verhältniszahlen der Peroxydasewirkung:

	a) befruchtet	b) unbefruchtet
1. Entwicklungsstufe . .	1,00	1,00
2. „ . .	1,078	1,081
3. „ . .	1,43	1,45
4. „ . .	2,18	2,51
5. „ . .	3,01	—
6. „	4,03—4,57	> 4,97

Am einfachsten wäre es, dieses Anwachsen der Wirksamkeit dadurch zu erklären, daß die Konzentration der Peroxydase in dem Maße zunimmt, in dem die Griffel vertrocknen. Daß dem jedoch nicht so ist, geht daraus hervor, wenn man die Zunahme der Peroxydasewirkung aus der Trockensubstanz der Griffel berechnet und die so erhaltenen Zahlen mit den tatsächlichen Befunden vergleicht, wie dies folgende Zusammenstellung zeigt:

		2	3	4	5	6	
Peroxydase[1]	gefunden:	57,9	77,1	117,4	161,6	231,0	Befruchtet
	berechnet:	57,9	68,4	78,3	85,4	112,9	
Verhältniszahl	gefunden / berechnet:	1,0	1,12	1,5	1,9	2,1	
Peroxydase[1]	gefunden:	58,1	78,2	134,8	—	> 267,0	Unbefruchtet
	berechnet:	58,1	68,6	76,2	—	117,9	
Verhältniszahl	gefunden / berechnet:	1,0	1,4	1,76	—	> 2,1	

[1]) Gemessen in Milligramm Purpurogallin.

Noch größer müßte dieser Unterschied zwischen den berecheten und gefundenen Werten sein, wenn man die bei gereinigter Oxydase beobachtete Tatsache in Betracht zieht, daß die Wirkung der Peroxydase bei höheren Konzentrationen des Enzyms mit dieser nicht Schritt hält. Wenn sich also die Wirkung der Peroxydase gegen Ende des beobachteten Zeitraumes verstärkte, so ist dies auf eine tatsächliche Zunahme des Enzymsystems der Peroxydase zurückzuführen. Diese Zunahme ist in nicht befruchteten Griffeln noch stärker.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Oxygenase der Griffel, und zwar finden wir hier wieder die Konzentration in unbefruchteten Griffeln höher als in natürlich befruchteten, wie dies aus folgender Zusammenstellung ersichtlich ist:

		2	3	4	5	6	
Oxygenase	gefunden:	12,2	18,9	22,0	25,6	29,2	Befruchtet
	berechnet:	12,2	14,4	16,3	18,0	24,4	
Verhältnis $\frac{\text{gefunden}}{\text{berechnet}}$:		1,0	1,3	1,34	1,4	1,2	
Oxygenase	gefunden:	16,1	—	30,4	—	59,0	Unbefruchtet
	berechnet:	16,1	—	21,1	—	32,7	
Verhältnis $\frac{\text{gefunden}}{\text{berechnet}}$:		1,0	—	1,4	—	1,8	

Nachdem nun die Peroxydase nur dann zu voller Wirkung gelangen kann, wenn sie genügend Oxygenase zur Verfügung hat, versuchte ich, dies aus den erhaltenen Zahlen festzustellen. Ich berechnete hierzu das jeweilige Verhältnis der Peroxydasewirkung zu jener der Oxygenase. Dabei stellte sich heraus, daß dies anwächst, daß also im Laufe der Entwicklung immer ein größerer Überschuß an Peroxydase vorhanden ist, als es dem Anfangswerte des Verhältnisses $\frac{\text{Peroxydase}}{\text{Oxygenase}}$ entspräche, wie dies aus folgender Zusammenstellung erhellt:

	1	2	3	4	5	6
$\frac{\text{Peroxydase}}{\text{Oxygenase}}$:	3,3	4,7	4,1	5,3	6,3	7,0—8,4

Es wurde dann noch untersucht, wie sich die Peroxydase und ihre zugehörigen Peroxyde verhalten, wenn künstlich unbefruchtet erhaltene Griffel später künstlich befruchtet werden.

Dabei ergab sich, daß die Konzentration der Oxygenase höher, jene der Peroxydase niedriger war, als bei natürlich, also in einem früheren Stadium befruchteten Griffeln.

Aus all diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Peroxydase in den Griffeln nur teilweise einer vollwertigen Oxydase entspricht und in den Griffeln während des Befruchtungsaktes fortwährend anwachsend, gemäß der Theorie Palladins[1]) von der Pflanzenatmung eine immer stärker werdende Atmung verursachen muß. Die starke Steigerung der Oxydasenwirkung bei Eintritt des Absterbens der Griffel erfolgt jedoch einerseits infolge des Absterbens der Zellen, wodurch die Enzyme in Ermangelung der regulatorischen Tätigkeit ihre Wirkung frei entfalten, was noch durch eine Neubildung von Oxydase (Peroxydase + Oxygenase) — zweifelsohne infolge eingetretener Autolyse — sowie durch die Austrocknung bedingte Konzentrierung gesteigert wird. Dagegen ist die höhere Konzentration der Oxydasen in unbefruchteten Griffeln als pathologisches Symptom zu deuten, ähnlich wie die Anreicherung an Oxydase und Tyrosinase in blattrollkranken Kartoffelknollen[2]) und Rübenblättern[3])[4]).

Experimentelles[5]).

Nachweis der Peroxydase. Mischt man den ausgepreßten Saft der Griffel oder des Kolbens mit etwas Wasserstoffsuperoxyd und Pyrogallol, so entsteht in einigen Augenblicken der charakteristisch rote krystallinische Niederschlag des Purpurogallins. Die Reaktion gelingt auch mit Saft, der monatelang aufbewahrt war, dagegen bleibt sie aus, wenn der Saft vorher aufgekocht wurde. Dementsprechend färben sich die frischen, grünen Griffel, wenn man sie zerkleinert, tiefbraun, was übrigens auch auf die Anwesenheit eines oxydablen Chromogens deutet;

---

[1]) Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **26a**, 1908; Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**, 207, 1908.

[2]) Doby, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. **21**, 321, 1911.

[3]) Bunzel, Bullet. 277, Bureau of Plant Ind., U. S. Dep. of agric.

[4]) Eine ähnliche Meinung über die Rolle der Oxydasen äußerte schon Grüß, erwähnt bei Sorauer, Internat. phytophath. Dienst **1**, 33, 1908, dann Pozzi-Escot (Chem. Centralbl. **1905**, I, 1032), sowie Woods.

[5]) Die Versuche wurden im chem. Laboratorium der kgl. ung. Versuchsstation f. Pflanzenphysiologie und Pflanzenkrankheiten ausgeführt.

hingegen behalten die Griffel ihre natürlich grüne Farbe, wenn man sie vorerst mit Alkohol oder Wasser aufkocht.

Reinigung und Eigenschaften der Peroxydase. Die frischen Pflanzenteile wurden mittels einer Hackmaschine zerkleinert, bei 300 Atm. Druck ausgepreßt und der Saft mit 96 %igem Alkohol fraktioniert gefällt; der durch weniger Alkohol gefällte Niederschlag enthielt mehr Asche und besaß eine geringere Aktivität als der aus dem Filtrat mit mehr Alkohol gefällte Niederschlag. Die einzelnen Fraktionen wurden nun zwecks weiterer Reinigung mit Wasser verrieben, filtriert und das Filtrat mit Alkohol wieder gefällt. Dies Verfahren wiederholte man so oft, bis sich der Niederschlag nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator in Wasser völlständig löste. Der gefällte Niederschlag wurde von der Flüssigkeit mittels Zentrifuge getrennt. Bei den letzten 3 bis 4 Fällungen verwendete ich wasserfreien Methylalkohol, was sich aus zweierlei Gründen bewährte; erstens ballte sich der bei diesen Fällungen in feiner Emulsion suspendierte Niederschlag viel rascher zusammen und konnte daher noch immer verhältnismäßig leicht von der Flüssigkeit getrennt werden; zweitens löste Methylalkohol den, dem Niederschlag hartnäckig anhaftenden, dunklen Farbstoff besser als Äthylalkohol.

Leider gelang es mir jedoch nicht, diesen Farbstoff völlig zu entfernen, so daß die feucht beinahe weißen Niederschläge getrocknet stets dunkel gefärbt waren. Die so erhaltenen Präparate zu dyalisieren wagte ich nicht wegen der damit verbundenen beträchtlichen Verluste. Aus etwa $2^1/_2$ kg Griffeln konnte ich so 0,3 g reinstes Peroxydase-Präparat darstellen. Soweit es so geringe Mengen zuließen, trachtete ich besonders die Peroxydase der Griffel näher zu untersuchen.

Die im luftverdünnten Raum bei gewöhnlicher Temperatur über konzentrierter Schwefelsäure getrockneten Präparate wiesen folgende Aschegehalte auf:

	Aus Griffeln:		Aus den Kolben:	
	A_1 (reinst)	A_2	B_1 (reinst)	B_2
Asche %ige	7,8	9,3—12,2	5,3	6,0

Mangan vermochte ich mit dem Bleiperoxyd-Salpetrigsäure-

Verfahren nicht nachweisen, aber Eisen enthielt jedes Präparat, sowie auch Alkalisalze.

Die Präparate gaben folgende Reaktionen:

1. Die Molischsche Reaktion mit α-Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure sofort intensiv dunkel veilchenblau.

2. Biuretreaktion war nicht vorhanden.

3. Mit Millons Reagens keine Änderung.

4. Fehlingsche Lösung wurde nicht reduziert.

5. In Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd erhielt ich folgende Reaktionen: Mit Hydrochinon rote Verfärbung und Ausscheidung der grünen Krystalle des Chinhydrons. — Mit Vanillin ein weißer Niederschlag von Dehydrodivanillin. — Mit Guajacol roter Farbenumschlag, dann Ausscheidung von Tetraguajacochinon. — Mit Ursol vorerst grüner, dann schwärzlich veilchenblauer Farbenwechsel. — Mit Guajakharzemulsion blaue Farbe. — Mit Jodkalium Ausscheidung von Jod. Dieser Versuch wurde wie folgt angestellt. 50 ccm der Lösung enthielten 0,08 g KJ, 0,02 g H_2O_2, 0,03 g Essigsäure und 0,01 g Peroxydase; die Kontrollösung ohne Peroxydase. Die Flüssigkeiten wurden 15 Minuten nach dem Zumischen des Wasserstoffsuperoxyds mit einer $^n/_{100}$-Natriumthiosulfatlösung titriert. Die Ergebnisse waren folgende:

Kontrollösung . . . 4,45 ccm $^n/_{100}$-$Na_2S_2O_3$
Peroxydaselösung . . 8,3 ccm $^n/_{100}$-$Na_2S_2O_3$.

6. Im Peroxydasepräparat der Griffel konnten folgende Enzyme nicht nachgewiesen werden:

Invertase, Amylase, Maltase, Emulsin, Zymase, Tyrosinase, pepsinartiges proteolytisches Enzym, Oxygenase. Dagegen waren Spuren von Katalase vorhanden. Die Peroxydase der Kolben wurde nur auf Tyrosinase und Protease untersucht, ebenfalls mit negativem Erfolg; Oxygenase enthielt dieselbe auch nicht.

Das Aktivierungsvermögen der Peroxydase der Griffel erwies sich zu 2, jenes der Kolben zu 1,3 und war daher ziemlich gering. Die diesbezüglichen Versuche waren folgende:

Auf 1 g Pyrogallol wirkte in 50 ccm gesamter Lösung bei wechselnden Mengen von Wasserstoffsuperoxyd je 0,01 g Peroxydase ein; die Menge des in 22 Stunden bei 19° sich abscheidenden und mit 100 ccm kaltem Wasser gewaschenen Purpurogallins wurde als Maß der Peroxydasewirkung betrachtet.

Präparat A_1.

H_2O_2 g	0,00085	0,0017	0,0068	0,0136	**0,0204**	0,0306	0,042	0,085	0,17
H_2O_2 mol. pro Liter	0,0005	0,001	0,004	0,008	**0,012**	0,018	0,025	0,05	0,1
Purpurogallin mg .	Spuren	4,8	16,2	28,4	**38,0**	33,0	27,9	18,5	13,2

Präparat B_1.

H_2O_2 g	0,0034	0,0068	0,0102	**0,0136**	0,017	0,0204	0,0272	0,034	0,068
H_2O_2 mol. pro Liter	0,002	0,004	0,006	**0,008**	0,01	0,012	0,016	0,02	0,04
Purpurogallin mg .	6,5	13,1	18,4	**21,5**	20,6	15,2	12,0	10,0	6,0

Die größte Menge Purpurogallin entstand also bei A_1 mit 0,0204 g H_2O_2, bei B_1 mit 0,0136 g H_2O_2.

Bei Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Konzentration und Wirkungsgrad der Peroxydase brachte ich diese stets mit der ihrem Aktivierungsvermögen entsprechenden Menge Wasserstoffsuperoxyd zusammen; als Substrat dienten auch hier 50 ccm einer 2%igen Lösung von Pyrogallol:

H_2O_2 g	0,00204	0,00408	0,00816	0,00163	0,0326	0,0653	0,1306
Peroxydase g	0,001	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064
Purpurogallin mg { gefunden	4,3	8,7	16,2	31,2	51,8	63,8	85,8
Purpurogallin mg { berechnet	4,3	8,6	17,2	34,4	68,8	137,6	275,2

Die Größe des durch die Peroxydase vermittelten Umsatzes ist also nur bei den unteren Konzentrationen mit diesen proportional, während sie bei den höheren Konzentrationen alsbald, bei den höchsten sogar erheblich zurückbleibt. Dies erklärt sich aus der großen Empfindlichkeit des Präparates gegen Wasserstoffsuperoxyd, was mit den Befunden anderer Forscher an anderen Peroxydasepräparaten in Einklang ist.

Meine Peroxydasen wurden in Lösung schon durch 10 Sekunden langes Kochen, das Enzym der Griffel sogar schon bei 90° inaktiviert; jedoch wurden die Lösungen nach einem tagelangen Aufbewahren bei gewöhnlicher Temperatur wieder reaktiviert:

		10″ gekocht	1 Tag nach dem Aufkochen	Ohne Aufkochen
Purpurogallin in mg von 0,01 g Peroxydase	A_1	0	13,2	38,0
	B_1	0	10,9	21,5

Diese Enzyme haben also ein kochbeständiges Zymogen.

Ich trachtete meine Peroxydase auch durch den Einfluß fremder Verbindungen auf ihre Wirkung zu charakterisieren,

leider können aber diese Versuche höchstens den Anspruch vorläufiger Orientierung haben, da ich für diese Zwecke über eine viel zu geringe Menge der Präparate verfügte. So untersuchte ich die aktivierende Wirkung von Ferro- und Manganosulfat, da einige Forscher[1]) besonders auf Grund von Untersuchungen Bertrands[2]) der Ansicht sind, daß die Oxydasen eigentlich keine Enzyme sind, sondern bloß aus kolloidalen Eisen- und Manganverbindungen bestehen. — Meine Versuche deuteten daraufhin, daß Ferrosulfat in starker Verdünnung ($^1/_{10000}$ mol) indifferent, bei höherer Konzentration hemmend wirkt, während Mangan mäßig aktivierte. — Ich möchte hier bemerken, daß unter meinen Präparaten eben jene am wirksamsten waren, deren Eisenreaktion sich als am schwächsten erwies. Dies ist ein indirekter Beweis dafür, daß meine Peroxydasen keine kolloidalen Eisensalze, sondern Enzyme bzw. Induktoren[3]) im eigentlichen Sinne des Wortes waren.

Weiter war es von Interesse zu untersuchen, ob Kohlenhydrate und Zucker keinen Einfluß auf die Wirkung der Peroxydase ausüben, was bisher noch kaum Gegenstand von Untersuchungen war. Und doch liegt dieser Gedanke nahe, da ja diese Verbindungen als Substrate der Atmung an derselben unmittelbar beteiligt sind und daher irgendwelche Wirkung dieser sehr verbreiteten und besonders auch in den Griffeln der Maisblüten in großer Menge vorhandenen Verbindungen auf die, zu den Atmungsenzymen gehörenden Oxydasen vorauszusetzen war. Die Versuche wurden mit einem etwas unreineren Präparate unter ähnlichen Verhältnissen wie die früheren ausgeführt und ergaben bei Zugabe folgender Verbindungen diese Ergebnisse:

		10%	4%	10%	10%	2%
Fremde Verbindung .	0	Glucose,	Fructose,	Rohrzucker,	Maltose,	Stärke
Purpurogallin in mg	9,4	9,5	8,1	7,2	7,2	8,2

[1]) Trillat, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **137**, 922, 1903 und **138**, 94 und 274; Dony-Hénault und van Duuren, Chem. Centralbl. **1908**, I, 2184.

[2]) Bertrand, Compt. rend. de l'Acad. d. sc. **124**, 1032 und 1358, 1897.

[3]) Siehe Engler und Hertzog, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 327, 1909.

Es bestätigte sich also die Voraussetzung, daß Zucker und Kohlenhydrate auf die Tätigkeit der Oxydasen eine Wirkung, und zwar in den angewendeten Konzentrationen, eine hemmende Wirkung ausüben. Was die nähere Ursache dieser Erscheinung darstellt, bleibt natürlich weiteren Versuchen vorbehalten, die ich jedoch infolge der geringen Menge meiner Präparate vorläufig nicht ausführen konnte, und erwähnte ich daher diese meine Versuche in vollem Bewußtsein dessen, daß sie bloß orientierende Vorversuche vorstellen.

Veränderung des Enzymsystems der Peroxydase und Oxygenase während der Entwicklung des Kolbens. Bei diesen Versuchen mußte man besonderes Gewicht darauf legen, daß die verwendeten Pflanzenteile durchwegs von Pflanzen derselben, rein gezüchteten Varietät entstammen und daß alle auf die Entwicklung einwirkenden Faktoren (Anbau, Boden usw.) die nämlichen seien, da dies, wie aus meinen an Kartoffeln gemachten Beobachtungen hervorgeht[1]), von ausschlaggebendem Einfluß auf die Konzentration, bzw. Wirkung der Enzyme, speziell der Oxydasen ist. Es wurden also zu den Versuchen nur die Kolben jener Pflanzen verwendet, die den Samen eines einzigen, rein gezüchteten Kolbens[2]) entstammten und auf einer kleinen Parzelle eigens angebaut wurden. Die Kolben für die einzelnen Versuche wurden in größerer Zahl (je nach Größe derselben etwa 15 bis 60 Stück) von verschiedenen Teilen der Parzelle entnommen, um so die individuellen Schwankungen möglichst auszuschalten. Der bei einem Druck von 300 Atm. erhaltene Saft wurde sofort, nach Zugabe von etwa 3% Toluol, mit Eis gekühlt und an einem dunklem Orte so lange durch Schleichersches Filtrierpapier wiederholt filtriert, bis man eine blanke Lösung erhielt. Diese Operation nahm stets 5 bis 6 Stunden in Anspruch. Die Lösung wurde dann zu den Bestimmungen wie folgt verwendet.

100 ccm der Reaktionsflüssigkeit enthielten 1 g Pyrogallol, wechselnde Mengen Wasserstoffsuperoxyd und 2,5 ccm Enzymlösung. Bei jeder Bestimmung wurde ein Reihenversuch gemacht, in dem jene Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds

[1]) Doby, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 21, 321, 1911.

[2]) Diesen Kolben verdanke ich dem Entgegenkommen des kgl. ungar. Instituts für Pflanzenveredelung.

festgestellt wurde, bei der sich die größte Menge Purpurogallin abschied. Diese Menge diente als Maß der Peroxydasewirkung. Als Beispiel führe ich eine dieser Reihen an:

100 ccm der Flüssigkeit enthielten außer Pyrogallol und der Enzymlösung:

H_2O_2 in g:

0,02 0,04 0,06 **0,09** 0,12 0,15 0,18 0,22.

Ausgeschiedenes Purpurogallin in mg:

80,9 99,3 124,1 **170,7** 146,1 133,7 121,5 111,3.

Nach 22stündigem Stehen der Flüssigkeit bei 20 bis 22° filtrierte man das Purpurogallin in Gooch-Tiegeln, wusch es mit 100 ccm kaltem Wasser und wog es nach dem Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz. Die so erhaltenen maximalen Purpurogallinmengen — als Maß der Peroxydasewirkung — sind in folgender Zusammenstellung enthalten:

Nr. der Aufnahme	Datum	Grad der Entwicklung	A Peroxydase d. Griffel		B Perodydase d. Fruchtknoten		C Peroxydase d. Hauptachse	
			H_2O_2 in 100 ccm	Purpurogallin	H_2O_2 in 100 ccm	Purpurogallin	H_2O_2 in 100 ccm	Purpurogallin
			g	mg	g	mg	g	mg
1	13. VII.	Die Griffel ragten noch nicht aus der Blätterhülle heraus	0,03	53,7	0,06	93,3	0,04	51,5
2	16.	Das Ende der Griffel erschien eben, viel Blütenstaub fällt	0,04	57,9	0,03	63,1	0,03	52,2
3	19.	Die Griffel völlig entwickelt, aber noch ohne einem Anzeichen des Welkens . . .	0,04	77,1	0,04	81,0	0,04	52,8
4	24.	Das Ende der Griffel beginnt zu welken, ist aber noch kaum braun	0,06	117,4	0,04	72,2	0,04	45,5
5	28.	Griffel schon ziemlich verwelkt, der untere Teil ihres hervorragenden Endes jedoch noch grün	0,12	161,6	0,04	74,7	0,04	47,9
6a)	1. VIII.	Der herausragende Teil der Griffel größtenteils vertrocknet u. braun, unter der Blätterhülle jedoch noch grün; der Strunk ziemlich verholzt	0,15	245,6	0,06	108,0	0,04	44,2
6b)	2.	do. . .	0,12	216,5	—	—	—	—

Während also die Konzentration der Peroxydase — und gleichzeitig auch die günstigste Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds — in den Griffeln fortwährend ansteigt, bleibt sie bei den Fruchtknoten und im Strunk in derselben Höhe und fällt sogar in letzteren etwas.

Die Werte der Oxygenase[1]) wurden ähnlich wie die der Peroxydase bestimmt, bloß die Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd unterließ man; daher war hier stets nur eine Bestimmung nötig. Die erhaltenen Werte waren folgende:

Nr. der Aufnahme		1	2	3	4	5	6
Purpurogallin, mg	A.	16,3	12,2	18,9	22,0	25,6	29,2
	B.	0	0	2,6	0,9	1,6	0
	C.	0	0	0	0	0	0

Wirkung des Befruchtens auf das Enzymsystem der Peroxydase und Oxygenase. Die zur Untersuchung dieses Satzes nötigen Versuche wurden so ausgeführt, daß man die im vorhergehenden detaillierten Bestimmungen auch an künstlich unbefruchtet erhaltenen Kolben vollzog. Hierzu wurden die Kolben einer Anzahl Pflanzen mit feinem Tüll, dessen Undurchlässigkeit für Pollen vorher erprobt wurde, umhüllt, bevor die Griffel noch zwischen den Hüllblättern hervordrangen. Jedoch verlängerte sich durch das Enthalten der Befruchtung die Lebensdauer der Griffel, auch wuchsen sie zu einer 2 bis 3 maligen Länge so, daß sich hierdurch die bei der Entnahme der Proben beobachteten Merkmale verzögerten. Daher fallen die Zeitpunkte dieser Bestimmungen mit den früheren nicht zusammen. Die erhaltenen Ergebnisse sind für Peroxydase folgende:

Aufnahme	Datum	A		B		C	
		H_2O_2 in 100 ccm g	Purpurogallin mg	H_2O_2 in 100 ccm g	Purpurogallin mg	H_2O_2 in 100 ccm g	Purpurogallin mg
1	13. VII.	0,03	53,7	0,06	93,3	0,04	51,5
2	17	0,04	58,1	0,06	86,0	0,03	51,0
3	20	0,06	78,2	0,04	77,9	0,04	44,8
4	31	0,08	134,8	0,04	75,5	0,04	51,5
6	18. VIII.	0,15	267,0[1])	0,08	122,2	0,04	60,9

[1]) Bzw. richtiger gesagt: Die Werte jenes Teiles der Peroxydase, der mit Oxygenase zusammen als vollwertige Oxydase vorhanden ist.

Die Werte der Oxygenase:

Aufnahme Nr. . . .		1	2	3	4	6
Purpuro-	A.	16,3	16,1	11,4	30,4	59,0
gallin	B.	0	0	0	0	4,8
mg	C.	0	0	1,0	0	0

Zum Schluß führe ich noch die Ergebnisse der Trockensubstanzbestimmungen an, die ich beim Berechnen der theoretischen Werte der Peroxydase bei Griffeln benutzte:

	Trockensubstanz %:				
a) in befruchteten Griffeln . . .	9,9	11,7	13,4	14,6	19,3
b) „ unbefruchteten „ . . .	9,9	11,7	13,0	0	20,1

[1]) Diese Zahl war in Wirklichkeit noch höher, jedoch hatte ich bei ihrer Bestimmung hierauf nicht gerechnet und demnach die höchste Konzentration des H_2O_2 zu klein bemessen.

Weitere Versuche über die Reaktion zwischen Antikörper und gelöstem Antigen.

Von

Friedericke Krauß.

(Aus dem Hygienischen Institut der Deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 8. Mai 1914.)

Wenn man einen von Bakterien befreiten Bakterienextrakt mit spezifischem, präcipitierendem Immunserum mischt und nach eingetretener Präcipitation das Präcipitat durch Zentrifugieren entfernt, so wirkt dieses komplementbindend, während der auspräcipitierte Extrakt seine komplementbindende Fähigkeit verloren hat. Diese Erscheinung ist damit zu erklären, daß das Immunserum die bindenden Gruppen des Extraktes ausfällt, und zwar in der Weise, daß es mit ihnen eine Verankerung eingeht, wodurch dann im Präcipitat der komplementbindende Antigen-Antikörperkomplex vorhanden ist. Nun konnten wir aber in einer früheren Mitteilung[1]) feststellen, daß das Immunserum in genau derselben Weise wirkt, wenn es bereits an Bakterien verankert ist. Die diesbezüglichen Versuche wurden derart angestellt, daß mit aktivem Serum sensibilisierte Bakterien auf den homologen Bakterienextrakt einwirkten und hierauf durch Zentrifugieren entfernt wurden. Der Extrakt hatte nun die komplementbindende Kraft verloren. Durch entsprechende Kontrollen wurde die Spezifität dieses Vorganges sichergestellt. Mit der jetzt geltenden Anschauung ist diese Erscheinung nicht zu vereinbaren, denn da die haptophoren Gruppen des Immunserums bereits an die Bakterien verankert sind, so ist eine Einwirkung auf den Extrakt, die ja mittels derselben zustande kommen müßte, nicht verständlich,

[1]) Diese Zeitschr. **56**, Heft 5 u. 6.

Versuche 1 und 2.

I. 1 ccm Extrakt als solcher.

II. 1 ccm Extrakt, 1 Stunde mit dem 6. Teil der zur Extraktbereitung zurückgebliebenen Bakterien (einer Kultur entsprechend) behandelt.

III. 1 ccm Extrakt, mit ebensoviel Bakterien behandelt. Diese Bakterien wurden vorher mit 0,3 ccm nativem Immunserum sensibilisiert, nach ½ Stunde zentrifugiert und 5 mal gewaschen.

IV. 1 ccm Extrakt, mit ebensoviel Bakterien, die mit 3 ccm Immunserum, das vorher in der Verdünnung 1 : 10 ½ Stunde auf 71° erhitzt war, 1 Stunde behandelt.

Die Extraktbereitung geschah in der Weise, daß der Bakterieninhalt einer Kolleschen Schale, mit 20 ccm NaCl abgespült, 1 Stunde bei 60° erhitzt und danach vollständig klar zentrifugiert wurde (Bodensatz ebenfalls zum Versuch).

Die zu verwendende Extraktmenge wurde in einem Vorversuche festgestellt.

Versuch 1. Vibrio g. Kaninchen-Immunserum, nativ, + Extrakt			Resultat	Versuch 2. Resultat des Versuchs 2. Versuchsanordnung wie bei Versuch 1, nur mit Meerschweinchen-Immunserum.	
Extrakt I als solcher.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extr. I 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. — Kontrolle + 0,2 „ „	Zu allen Röhrchen 0,05 ccm Komplement und nach 1 Stunde bei 37° je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 k	Extrakt I	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k Kontrolle
Extrakt II, behandelt mit unsensibilisierten Bakterien.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extr. II 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. — Kontrolle + 0,2 „ „		0 0 0 0 k	Extrakt II	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k Kontrolle
Extrakt III, behandelt mit Bakterien, die mit nativem Immunserum sensibilisiert waren.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extr. III 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. — Kontrolle + 0,2 „ „		f. k k k k k	Extrakt III	1. k 2. k 3. k 4. k 5. k
Extrakt IV, behandelt mit Bakterien, die mit auf 71° erhitztem Serum sensibilisiert waren.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extr. IV 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. 0,05 „ Kontr. — „ „ 6. — Kontrolle + 0,2 „ „		0 0 0 0 k k	Extrakt IV	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k } Kontrollen 6. k } Kontrollen

Zeichen: k = komplett, f. k = fast komplett, st. = starke Lösung, 0 = Hemmung.

Diese Versuche wurden mit einem aus der Elbe gezüchteten Vibrio, der die Bezeichnung „Vibrio a 10875/11, leuchtend“ (aus der Sammlung von Prof. Dunbar, Hamburg) trägt, aus-

Versuche 3 und 4.

Die Behandlung der Extrakte II, III und IV (diesmal wurden die Versuche mit Vibrio a durchgeführt) genau wie in den Versuchen 1 und 2, ebenso auch die Extraktbereitung.

Zu Versuch 3 wurde Kaninchen-, zu Versuch 4 Meerschweinchen-Immunserum a verwendet.

Versuch 3. Vibrio a. Kaninchen-Immunserum + Extrakt					Resultat	Versuch 4. Resultat des Versuchs 4, bei genau derselben Versuchsanordnung wie bei Versuch 3, nur mit Meerschweinchen-Immunserum.	
Extrakt I als solcher.	1. 0,05 ccm	+ 0,2 ccm	Extr. I	Zu allen Röhrchen 0,05 ccm Komplement und nach 1 Stunde 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen	0	Extrakt I	1. 0
	2. 0,025 „	+ 0,2 „	„		0		2. 0
	3. 0,01 „	+ 0,2 „	„		0		3. 0
	4. 0,005 „	+ 0,2 „	„		0		4. 0
	5. — Kontrolle	+ 0,2 „	„		k		5. k Kontrolle
Extrakt II, behandelt mit unsensibilisierten Bakterien.	1. 0,05 ccm	+ 0,2 ccm	Extr. II		0	Extrakt II	1. 0
	2. 0,025 „	+ 0,2 „	„		0		2. 0
	3. 0,01 „	+ 0,2 „	„		0		3. 0
	4. 0,005 „	+ 0,2 „	„		0		4. 0
	5. — Kontrolle	+ 0,2 „	„		k		5. k Kontrolle
Extrakt III, behandelt mit Bakterien, die vorher mit nativ. Immunserum sensibilisiert waren.	1. 0,05 ccm	+ 0,2 ccm	Extr. III		deutl.	Extrakt III	1. s. st.
	2. 0,025 „	+ 0,2 „	„		st.		2. f. k
	3. 0,01 „	+ 0,2 „	„		f. k		3. k
	4. 0,005 „	+ 0,2 „	„		k		4. k
	5. — Kontrolle	+ 0,2 „	„		k		5. k Kontrolle
Extrakt IV, behandelt mit Bakterien, die vorher mit auf 71° erhitztem Serum behandelt waren.	1. 0,05 ccm	+ 0,2 ccm	Extr. IV		0	Extrakt IV	1. 0
	2. 0,025 „	+ 0,2 „	„		0		2. 0
	3. 0,01 „	+ 0,2 „	„		0		3. 0
	4. 0,005 „	+ 0,2 „	„		0		4. 0
	5. — Kontrolle	+ 0,2 „	„		k		5. k } Kontrollen
	6. 0,05 ccm	+ — Kontrolle			k		6. k }

geführt, und es schien von großem Interesse, diese Versuche weiter auszudehnen. Wir haben nun diese Experimente mit verschiedenen Bakterien einerseits, andererseits mit Immunseris von Kaninchen und Meerschweinchen angestellt. Die beiden vorstehenden Versuche wurden mit „Vibrio g 11608/11, nichtleuchtend“ (ebenfalls aus der oben angeführten Sammlung) ausgeführt, und zwar mit Immunserum vom Kaninchen und vom Meerschweinchen (Versuche 1 und 2). Diese bilden eine Bestätigung unserer früher mitgeteilten Experimente, indem sie zeigen, daß der Extrakt für die Komplementbindung vollständig unwirksam wird, wenn er mit Bakterien, die mit aktivem Immunserum sensibilisiert waren, behandelt wurde. Die Bakterien ohne Immunserum sowohl (Kol. II) als auch die,

Versuche 5 und 6.

Diese Versuche wurden mit Cholera 74, mit Kaninchen- und Meerschweinchen-Immunserum durchgeführt. Extraktbereitung und Behandlung der Extrakte wie bisher.

Veruch 5. Vibrio a. Kaninchen-Immunserum, nativ, + Extrakt			Resultat	Versuch 6. Resultat des Versuches 6, bei derselben Versuchsanordnung wie 5, nur mit Meerschweinchen-Immunserum	
Extrakt I als solcher.	1. 0,05 ccm + 0,25 ccm Extrakt I 2. 0,025 „ + 0,25 „ „ 3. 0,01 „ + 0,25 „ „ 4. 0,015 „ + 0,25 „ „ 5. — + 0,25 „ „	Zu jedem Röhrchen 0,05 Komplement und nach 1 Stunde bei 37° je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen.	0 0 0 Spur k	Extr. I.	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k
Extrakt II, behandelt mit unsensibilisierten Bakterien.	1. 0,05 ccm + 0,25 ccm Extr. II 2. 0,025 „ + 0,25 „ „ 3. 0,01 „ + 0,25 „ „ 4. 0,005 „ + 0,25 „ „ 5. — + 0,25 „ „		0 0 0 0 k	Extr. II.	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k
Extrakt III, behandelt mit Bakterien, die vorher mit nativem Immunserum sensibilisiert waren	1. 0,15 ccm + 0,25 ccm Extr. III 2. 0,025 „ + 0,25 „ „ 3. 0,01 „ + 0,25 „ „ 4. 0,005 „ + 0,25 „ „ 5. — „ + 0,25 „ „		f. k k k k k	Extr. III.	1. deutl. 2. stark 3. k 4. k 5. k
Extrakt IV, behandelt mit Bakterien, die vorher mit auf 71° erhitztem Immunserum sensibilisiert waren.	1. 0,05 ccm + 0,25 ccm Extr. IV 2. 0,025 „ + 0,25 „ „ 3. 0,01 „ + 0,25 „ „ 4. 0,005 „ + 0,25 „ „ 5. — „ + 0,25 „ „ 6. 0,05 „ — „		0 0 0 0 k k	Extr. IV.	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k 6. k

welche mit erhitztem Serum behandelt sind, erweisen sich dem Extrakt gegenüber als unwirksam. Dies deutet darauf hin, daß die präcipitierende Fähigkeit des Immunserums, das durch Erhitzen auf 70 bis 71° zum großen Teil zerstört wurde, für die Neutralisierung des Extraktes verantwortlich gemacht werden muß.

Versuch 3 und 4. Der mit Vibrio a (der schon früher verwendet wurde) angestellte Versuch ergibt genau dasselbe Resultat.

Ebenso die Versuche 5 und 6, die mit Cholera 74 angestellt wurden.

Von Interesse waren schließlich die Versuche mit Typhus. Versuch 7 und 8. Einerseits deshalb, weil die Erzeugung hochwertiger komplementbindender Antikörper mit Typhusbacillen

Versuche 7 und 8.

Bereitung des Extraktes (mit Typhus k) und die verschiedene Behandlung der Extrakte II bis IV wie bisher.

Versuch 7. Typhus-Kaninchen-Immunserum, nativ, + Extrakt		Resultat	Versuch 8. Resultat des Versuches 8, bei genau derselben Versuchsanordnung, nur mit Meerschweinchen-Immunserum	
Extrakt I als solcher.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extrakt I 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. — + 0,2 „ „	0 0 0 Spur k	Extr. I.	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k Kontrolle
Extrakt II, behandelt mit unsensibilisierten Bakterien.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extr. II 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. — + 0,2 „ „	0 0 0 0 k	Extr. II.	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k Kontrolle
Extrakt III, behandelt mit Bakterien, die vorher mit nativem Immunserum sensibilisiert waren.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extr. III 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. — + 0,2 „ „	deutl. st. k k k	Extr. III.	1. deutl. 2. k 3. k 4. k 5. k Kontrolle
Extrakt IV, behandelt mit Bakterien, die vorher mit auf 71° erhitztem Serum sensibilisiert waren.	1. 0,05 ccm + 0,2 ccm Extr. IV 2. 0,025 „ + 0,2 „ „ 3. 0,01 „ + 0,2 „ „ 4. 0,005 „ + 0,2 „ „ 5. — + 1,2 „ „ 6. 0,05 „ — „	0 0 0 Spur k k	Extr. IV.	1. 0 2. 0 3. 0 4. 0 5. k } Kontrollen 6. k }

Zu jedem Röhrchen 0,05 Komplement und nach 1 Stunde je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen

nicht so leicht gelingt, andererseits aus dem Grunde, weil Typhus-Immunsera in der Regel nicht eine so starke präcipitierende Kraft aufweisen wie mit Vibrionen hergestellte Sera. Durch intensive Vorbehandlung von Tieren, insbesondere von Meerschweinchen, ist es uns jedoch auch gelungen, gegenüber Typhus Immunsera von starker komplementbindender Fähigkeit zu gewinnen. Die Versuche fielen nun in der Tat im Prinzip genau so aus wie die vorher mitgeteilten. Doch tritt bei allen Versuchen deutlich hervor, daß es bei Kaninchen-Immunseris nicht so leicht gelingt, durch sensibilisierte Bakterien eine Neutralisierung des Extraktes zu erzielen wie bei Meerschweinchen-Immunseris. Es ist wahrscheinlich, daß es sich hierbei nur um eine quantitative Differenz handelt, da die Meerschweinchen einer bedeutend intensiveren Vorbehandlung unter-

zogen wurden, wodurch auch die Wirksamkeit der Antikörper von diesen Tieren viel stärker ausgebildet wurden.

Es geht also aus diesen Versuchen mit Sicherheit hervor, daß die in unserer früheren Mitteilung festgestellte Tatsache nicht eine Ausnahme darstellt, die nur bei einem Mikroorganismus auftritt, sondern daß sie ausnahmslos dort erzielt wird, wo es gelingt, komplementbindende und präcipitierende Antikörper zu erzeugen. Eine Erklärung dieser Erscheinung zu geben ist uns vor der Hand nicht möglich, so daß wir uns nur mit der Feststellung der Versuchstatsachen begnügen müssen, die aber immerhin die Revisionsbedürftigkeit derzeit herrschender Anschauungen erkennen lassen.

Über die Beziehungen der Milchsäure zum Kohlenhydratstoffwechsel.

I.

Über das Auftreten der Milchsäure im Kaninchenharn bei der Phosphorvergiftung[1]).

Von

Otto von Fürth.

(Eingegangen am 7. Mai 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Dank den Forschungsergebnissen der letzten Jahre hat sich das Problem des Ursprunges der Milchsäure und ihrer Rolle im Organismus immerhin soweit geklärt, daß ein enger Zusammenhang desselben mit den Fragen des Kohlenhydratstoffwechsels nicht mehr bezweifelt werden kann. Daß tierische Gewebe Traubenzucker zu Milchsäure umzuformen vermögen, wird man nach den schönen Durchblutungsversuchen Embdens und seiner Mitarbeiter, nach den Experimenten J. Müllers am durchbluteten Katzenherzen, sowie nach den Beobachtungen von Slosse und seinen Mitarbeitern über die Vorgänge der Glykolyse im Blute, als feststehende Tatsache betrachten dürfen. Unklar aber ist es, um nur einige der sich hier ergebenden offenen Fragen anzudeuten, ob der Zucker die ausschließliche Quelle der Milchsäure ist oder ob auch dem Eiweißmolekül entstammende Aminosäuren oder etwa das Glycerin Quellen der Milchsäure sein können; ob, wie Embden meint, der Hauptweg des Kohlenhydratabbaues im Organismus über die Milchsäure geht, oder ob es sich um einen

[1]) Eine vorläufige Mitteilung über einen Teil der hier mitgeteilten Beobachtungen ist gelegentlich des IX. internat. Physiologenkongresses September 1913 in Groningen erfolgt.

Nebenweg handelt, der nur beim Zusammentreffen gewisser Bedingungen eingeschlagen wird; unklar ist ferner die Art, wie der Zucker in Milchsäure übergeht, und die Rolle, die dem Glycerinaldehyd, der Brenztraubensäure und dem Methylglyoxal dabei zufällt; unklar sind endlich die weiteren Schicksale, denen die Milchsäure im Organismus anheimfällt, die Art, wie sich ihr Abbau vollzieht und die Faktoren, die es bewirken, daß diese an sich leicht verbrennliche Substanz unter abnormen Verhältnissen an der Oberfläche des Stoffwechsels zum Vorschein kommt. Es möge mir, um Weitschweifigkeiten zu vermeiden, gestattet sein, in bezug auf die sich hier ergebenden zahlreichen Probleme auf eine frühere Darstellung dieses Gegenstandes[1]), vor allem aber auf die lichtvollen Darlegungen Neubergs[2]), als eines der besten Kenner dieses Gebietes, hinzuweisen.

Wenn man nun gerade über die Ausscheidungsverhältnisse der Milchsäure ganz auffallend schlecht orientiert ist, so erscheint dies durch den Umstand ausreichend begründet, daß bis vor kurzem keine Methode existiert hat, die es ermöglicht hätte, über den Milchsäuregehalt des Harnes auch nur einigermaßen sichere Aufschlüsse zu gewinnen. Dieser Mangel erscheint nunmehr behoben, insofern H. Ishihara das von mir gemeinsam mit Charnass ausgearbeitete Bestimmungsverfahren der Milchsäure in wässerigen Lösungen auf meine Veranlassung hin der Ermittelung der Milchsäure im Harn dienstbar gemacht hat[3]).

Ich bin nun daran gegangen, mit Hilfe der neuen Methode eine Reihe von Problemen, die mit den Beziehungen der Milchsäure zum Kohlenhydratstoffwechsel in Zusammenhang stehen, in Angriff zu nehmen. Als erste Aufgabe dieser Art stellte ich mir das eingehendere Studium des Auftretens der Milchsäure im Kaninchenharn bei der Phosphorvergiftung.

Die Entdeckung des Auftretens von Milchsäure im Harn

---

[1]) O. v. Fürth, Probleme d. physiol. u. pathol. Chem. II, 443 bis 454, 1913.

[2]) C. Neuberg, Der Zuckerumsatz der Zelle. Handb. d. Biochem., Ergänzungsbd. 1913, 569 bis 609 u. Monogr. Wiesbaden, 1913.

[3]) H. Ishihara, Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure im Harn. (Ausgeführt unter Leitung von O. v. Fürth.) Diese Zeitschr. 50, 468, 1913.

bei der Phosphorvergiftung rührt bekanntlich von Schultzen und Rieß her. Dieselben fanden im menschlichen Harn bei der Phosphorvergiftung reichliche Mengen von Fleischmilchsäure, welche Verbindung sie auch bei der (in ihrem anatomischen Bilde an die Phosphorvergiftung erinnernden) akuten gelben Leberatrophie im Harn angetroffen hatten. Eine Reihe von späteren Beobachtern hat bei Untersuchung des Harnes phosphorvergifteter Menschen und Tiere die Milchsäure teilweise wiedergefunden, teilweise aber vermißt[1]).

Die eingehendsten einschlägigen Untersuchungen rühren von Araki[2]) her, der bei Kaninchen nach Vergiftung mit 0,01 bis 0,04 Phosphor im Harn so viel Milchsäure auftreten sah, daß er etwa 0,2 bis 0,5 g milchsauren Zinksalzes aus dem Tagesharn zu isolieren vermochte. Wie wir heute wissen, vermag das damals allgemein anerkannte und geübte Verfahren der Milchsäurebestimmung durch Ausschütteln der Säure mit Äther und Überführung in das Zinksalz in keiner Weise den Ansprüchen an ein quantitatives Verfahren zu genügen. Denn weder ist es möglich, die Milchsäure durch Ausschütteln einer wässerigen Flüssigkeit vollständig zu entziehen, noch ist irgend eine Gewähr dafür geboten, daß das aus dem Ätherextrakt des Harnes gewonnene schwerlösliche Zinksalz wirklich ausschließlich aus milchsaurem Zink bestehe, es wäre denn, daß dasselbe durch die Elementaranalyse identifiziert worden wäre.

Über die einfache Tatsache, daß im Harn bei der Phosphorvergiftung Milchsäure auftreten kann, war man mit diesen Beobachtungen nicht hinausgelangt.

Einem Versuche, dem Wesen dieses Vorganges näherzukommen, begegnen wir erst in einer (aus dem Wiener pharmakologischen Institute stammenden) Arbeit E. Neubauers[3]), der seine Versuchsergebnisse folgendermaßen zusammenfaßt: „Phosphorvergiftete Kaninchen verhalten sich Milchsäurezufuhr gegen-

[1]) Vgl. die Literatur bei O. Loewi, Arzneimittel und Gifte in ihrem Einfluß auf den Stoffwechsel, in Noordens Pathol. d. Stoffw. 2, 744 bis 745, 1907.

[2]) T. Araki, Über die Bildung von Milchsäure und Glykose im Organismus bei Sauerstoffmangel. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 303, 1891.

[3]) E. Neubauer, Über das Schicksal der Milchsäure bei normalen und phosphorvergifteten Tieren (Wiener pharmakol. Inst.). Arch. f. experim. Pathol. 61, 387, 1909.

über fast wie normale; sie verbrennen einen sehr großen Teil der zugeführten Säure und scheiden den Rest als Milchsäure und zum Teil in Form anderer ätherlöslicher Säuren aus. Der Anteil der Milchsäure an der Gesamtmenge ätherlöslicher Säuren ist gegenüber dem Normaltier, dem Milchsäure zugeführt wurde, kaum erhöht . . . In unseren Versuchen führte weder Zucker noch Alaninzufuhr zu einer Vermehrung ätherlöslicher Säuren im Harn, auch nicht bei Phosphortieren."

O. Löwi[1]) ist der Meinung, daß die bei der Phosphorvergiftung beobachteten Stoffwechselphänomene mit der Anschauung in Einklang gebracht werden können, das Gift setze die Energie der Oxydationsvorgänge in den Geweben herab. Hans H. Meyer[2]) charakterisiert die Wirkung des Phosphors auf die Gewebe als „stark vermehrten Gewebszerfall unter bedeutender Störung der Synthesen, Oxydationen und Spaltungen: der Sauerstoffverbrauch, die Kohlensäurebildung sind vermindert, es wird weniger Fett, dafür um so mehr Kohlenhydrat und Eiweiß zersetzt, jedoch zum Teil nur unvollständig abgebaut, so daß merkliche Mengen unfertiger Abbauprodukte (Amidosäuren, Peptone, Milchsäuren u. a. m.) im Blut und Harn gefunden werden."

Das Wesen der Stoffwechselstörung bei der Phosphorvergiftung, speziell in bezug auf den Umsatz der Kohlenhydrate, ist neuerdings von E. Frank und S. Isaak[3]) zum Gegenstande eingehender Studien gemacht worden. Bereits bei leichteren Graden der Phosphorvergiftung erscheint die Glykogenfixation in der Leber stark gestört, was sich durch den Schwund des Glykogens mit konsekutiver Fettanhäufung und durch die Unmöglichkeit, durch Zuckerzufuhr Glykogenansatz zu erzeugen, kundgibt. Bei der schweren Phosphorvergiftung scheint aber auch die Kohlenhydratsynthese in der Leber hochgradig geschädigt zu sein. Zum mindesten konnte gezeigt werden, daß bei schwervergifteten Tieren der Zucker-

[1]) O. Löwi, l. c. S. 749.

[2]) H. H. Meyer und R. Gottlieb, Experim. Pharmakol. **1910**, 341.

[3]) E. Frank und S. Isaak, Der Verlauf des experimentellen Diabetes bei phosphorvergifteten Tieren. Verhdl. d. XXVII. deutsch. Kongr. f. inn. Med. **1910**, 586. — Über das Wesen des gestörten Stoffwechsels bei der Phosphorvergiftung. Arch. f. experim. Pathol. **64**, 281, 1911; vgl. dort die ältere Literatur!

gehalt des Blutes stark abnimmt und kurz vor dem Tode den Nullwert erreicht. Als Folge einer elektiven Schädigung des Kohlenhydratstoffwechsels in der Leber wird auch folgende Beobachtung gedeutet: „Verabreicht man einem normalen Kaninchen ca. 10 g Dextrose pro Kilogramm per os, so zeigt sich nach 1 Stunde eine beträchtliche Hyperglykämie, die 4 Stunden nach der Infusion wieder stark im Abklingen begriffen, und nach weiteren 4 Stunden zur Norm zurückgekehrt ist. Das gleiche Verhalten zeigen auch Tiere, denen man einige Stunden nach der Injektion von Phosphor dieselbe Menge Traubenzucker eingeführt hat... Die Verhältnisse ändern sich aber, falls man den Zucker in einem vorgeschrittenen Stadium der Vergiftung zuführt... Hier findet man, daß... die Blutzuckerwerte selbst nach 10 Stunden noch eine beträchtliche Höhe haben... Dieses differente Verhalten der Blutzuckerkurve nach Dextrosezufuhr dürfte... auf eine Störung der Glykogenfunktion zu beziehen sein."

Eine (im Wiener pharmakol. Institut ausgeführte) Untersuchung von L. Pollak[1]) hat übrigens gelehrt, daß die phosphorvergiftete Leber, welche die Fähigkeit eingebüßt hat, aus Glucose Glykogen zu bilden, nach Lävulosezufuhr noch reichlich Glykogen zu bilden vermag.

Daß der Kohlenhydratstoffwechsel in toto durch die Phosphorvergiftung eine Einschränkung erfahre, wird neuerdings von Hirz[2]) geleugnet, insofern derselbe bei künstlicher Zuckerzufuhr den Gaswechsel seiner Versuchstiere auf normaler Höhe erhalten konnte. Ferner leugnet er, daß die Fähigkeit der Leber, Glykogen aufzubauen, durch die Vergiftung vollkommen aufgehoben werde, insofern dieselbe bei Rohrzuckerfütterung noch zur Geltung komme (was ja mit den vorerwähnten Beobachtungen Pollaks in Einklang steht). Auch vermochte der Genannte trotz Fütterung großer Zuckermengen bei seinen Tieren niemals, außer in der Agonie, Glucosurie zu beobachten.

Als für das uns interessierende Problem wichtig erscheint

---

[1]) L. Pollak (Pharmakol. Inst., Wien), Arch. f. experim. Pathol. **61**, 149, 1909.

[2]) O. Hirz (Marburger pharmakol. Inst.), Über den Einfluß des Phosphors auf den respiratorischen Stoffwechsel. Zeitschr. f. Biol. **60**, 187, 1913.

ferner eine Beobachtung von Mandel und Graham Lusk[1]), derzufolge die Milchsäure aus dem Blute und dem Harne phosphorvergifteter Tiere verschwindet, sobald bei denselben eine Phlorizinglucosurie eingeleitet wird. Die Autoren deuten dies in dem Sinne, daß die Dextrose, die bei der einfachen Phosphorvergiftung durch einen „anaeroben" Spaltungsvorgang in Milchsäure übergeht, infolge der Wirkung des Phlorizins eliminiert und so der weiteren Umwandlung in Milchsäure entzogen wird. Da die Genannten aber auch beobachtet haben, daß Phlorizintiere eingeführte Milchsäure in großem Umfange zur Zuckerproduktion zu verwerten vermögen[2]), könnte man den Vorgang auch so deuten, daß die bei der Phosphorintoxikation auftretende Milchsäure (gleichviel aus welcher Quelle auch immer sie stammen möge) bei der superponierten Phlorizinvergiftung zur Zuckerproduktion verbraucht wird, derart, daß sie nicht im Harn zum Vorschein kommt.

Bei Durchsicht der Milchsäureliteratur war mir nun vor allem das Fehlen eines klaren und eindeutigen Beweises für den tatsächlichen Übergang von Zucker in Milchsäure im lebenden Körper aufgefallen. Ausreichend bewiesen ist, wie wir eben gesehen haben, der umgekehrte Vorgang, nämlich das Vermögen des lebenden Organismus, Milchsäure in Zucker umzuwandeln. Daß der Organismus aber Zucker direkt in Milchsäure umzuwandeln vermöge, ist zwar durch Versuche an isolierten und überlebenden Organen und Organsäften, durch die Versuche über Glykolyse im Blute, sowie durch die Analogie mit den Vorgängen bakterieller Milchsäuregärung sehr wahrscheinlich geworden. Einen klaren Beweis dafür, daß ein solcher Übergang von Zucker in Milchsäure sich im lebenden Körper auch wirklich vollzieht, sowie eine Antwort auf die Frage, ob dieser Übergang ein unmittelbarer sei (derart etwa, wie bei der Milchsäuregärung 1 Molekül Zucker in 2 Moleküle Milchsäure zerfällt), oder ob er nur mittelbar und vom wechselnden

[1]) Mandel and Graham Lusk, Lactic acid in intermediary metabolism (Bellevue Hosp. med. College). Amer. Journ. of Physiol. **16**, 129, 1906.

[2]) Auch bei diabetischen Menschen bewirkt Zufuhr von milchsaurem Natron eine erhebliche Steigerung der Zuckerausscheidung. (N. B. Foster, Proc. Soc. experim. Biol. **10**, 136.)

Auftreten intermediärer Prozesse abhängig sei, vermochte ich aber in der Literatur nicht ausfindig zu machen.

Ich faßte daher den Entschluß, die durch die neue Bestimmungsmethode gebotene Möglichkeit, den zeitlichen Verlauf der Milchsäureausscheidung quantitativ zu verfolgen, zunächst dahin auszunützen, um am Beispiele der Phosphorintoxikation festzustellen, ob die Kurve der Milchsäureausscheidung im Harn durch künstliche Zuckerüberschwemmung irgendwie beeinflußt wird. Denn falls der lebende Organismus wirklich die Fähigkeit besitzt, das Zuckermolekül glatt und direkt zu Milchsäure umzuformen, so müßte man erwarten, daß bei einem Tiere, das unter Einwirkung des Phosphors die sonst leicht verbrennbare Milchsäure an die Oberfläche des Stoffwechsels fördert, eine Zuckerüberschwemmung des Organismus die Milchsäureausscheidung mächtig in die Höhe treiben dürfte.

Versuchsmethodik.

Als Versuchstiere dienten mir durchwegs mittelgroße Kaninchen. Dieselben erhielten ausschließlich Grünfutter. Um eine ausgiebige Harnausscheidung zu erzielen, wurde den Tieren bei den meisten Versuchen täglich 100 ccm Wasser per Schlundsonde in den Magen eingebracht. Bei den Zuckerversuchen wurden 30 g Glucose in diesem Flüssigkeitsquantum gelöst.

Der Harn wurde in Stoffwechselkäfigen gesammelt und in toluolhaltigen Gefäßen aufgefangen. Bei manchen der Versuche wurde der Tagesharn durch Abpressen abgegrenzt. In der Regel habe ich aber darauf verzichtet, da die Versuchsergebnisse nicht davon beeinflußt wurden, wenn etwa die Milchsäure, die im Blasenharn verblieben war, erst am nächsten Tage zum Vorschein kam.

Die Bestimmung der Milchsäure im Harn erfolgte nach dem von H. Ishihara ausgearbeiteten Vorgange, der von mir für den Menschenharn durch eine größere Versuchsreihe[1])

[1]) l. c. S. 478 bis 481. In bezug auf die Anwendbarkeit des von mir und Charnass ausgearbeiteten Milchsäurebestimmungsverfahrens auf den menschlichen Harn vgl. M. Dapper, Über die Bestimmung und das Vorkommen von Milchsäure im Harn (A. d. I. med. Klinik, Wien). Diese Zeitschr. 51, 398, 1913.

ausreichend ausgeprobt worden war. Ich habe mich durch einige weitere Versuche vergewissert, daß die Methode in gleicher Weise auch auf Kaninchenharn anwendbar ist.

1. 200 ccm normalen Kaninchen-Mischharnes, versetzt mit 40 g Milchsäure 0,8145% = 0,3258 g Milchsäure (Gehalt durch Titration mit Phenolphthalein ermittelt).

Die Milchsäurebestimmung ergab (nach 20stündiger Extraktion im Lindtschen Apparate)	0,3360 g	Milchsäure
Die präformierte Milchsäuremenge im gleichen Harnquantum	0,0123 g	„
	0,3237 g	Milchsäure = **99,3%**

2. 150 ccm Harn, versetzt mit 20 ccm Milchsäure 0,8460% = 0,1692 g Milchsäure.

Die Milchsäurebestimmung ergab . . .	0,1945 g	Milchsäure
Die präformierte Milchsäuremenge betrug	0,0270 g	„
	0,1675 g	Milchsäure = **99,0%**

Da die von Ishihara vorgeschriebene Ausfällung des Harnes mit Phosphorwolframsäure sich bei Ausführung zahlreicher Analysen als ziemlich kostspielig erwies, habe ich den Versuch gemacht, dieses Reagens durch Eisenchlorid zu ersetzen, derart also, daß der Harn mit Eisenchlorid, das Filtrat sodann mit Barytwasser ausgefällt, der Barytüberschuß mit Kohlensäure beseitigt und im übrigen der frühere Vorgang eingehalten wurde. Ich wollte so auch den Übergang der (im Kaninchenharn reichlich enthaltenen) Hippursäure in den Ätherextrakt verhindern.

3. 200 ccm Mischharn, versetzt mit 40 ccm Milchsäure 0,8460% = 0,3384 g Milchsäure, gefällt mit 25 ccm $FeCl_3$ 25%, das Filtat mit 125 ccm gesättigten Barytwassers.

Die Milchsäurebestimmung ergab . . .	0,3505 g	Milchsäure
Die präformierte Milchsäuremenge betrug	0,0175 g	„
	0,3330 g	Milchsäure = **98,5%**

4. 200 ccm Mischharn, versetzt mit 20 ccm Milchsäure 0,8460% = 0,1692 g Milchsäure.

Die Milchsäurebestimmung ergab . . .	0,1830 g	Milchsäure
Die präformierte Milchsäuremenge betrug	0,0175 g	„
	0,1655 g	Milchsäure = **97,8%**

Später bin ich aber, trotz dieser befriedigenden Resultate, wieder zur Phosphorwolframsäurefällung zurückgekehrt und zwar aus dem Grunde, weil ich mehrere Male nach der Eisenchloridfällung bei der Ätherextraktion im rotierenden Lindt-

schen Apparate eine Emulsionsbildung erhalten hatte, die es unmöglich machte, die Bestimmung zu Ende zu führen. Offenbar werden jene Harnbestandteile, die die Emulsionsbildung begünstigen, durch Eisenchlorid eben doch nicht so vollständig beseitigt, wie durch die Phosphorwolframsäure.

Als ein auffallender Unterschied zwischen der Milchsäurebestimmung im Menschen- und Kaninchenharn ergibt sich der Umstand, daß man in letzterem Falle bei der Oxydation mit Permanganat sehr viel mehr von diesem Reagens verbraucht, da der stark gefärbte Ätherextrakt neben der Milchsäure reichliche Mengen anderer Bestandteile von saurem Charakter (wie ich vermute, zyklischer Natur) enthält[1]), die gleichfalls vom Permanganat angegriffen werden und große Mengen von diesem verbrauchen. Arbeitet man daher, wie es Embden empfohlen und auch Ishihara bei der Analyse des Menschenharnes als zweckmäßig erkannt hat, nicht mit $^n/_{10}$-$KMnO_4$-Lösung, vielmehr mit $^n/_{50}$-Lösung, so zieht sich die Destillation des Aldehyds endlos in die Länge und das weitere Arbeiten wird durch die Menge des Destillats sehr erschwert. Ich bin daher beim Arbeiten mit Kaninchenharn notgedrungen wieder zu der $^n/_{10}$-Permanganatlösung unter Anwendung der von mir und Charnass ermittelten Korrektur (1 ccm verbrauchter $^n/_{10}$-Jodlösung statt mit 0,0045, mit 0,0050 in Rechnung gesetzt) zurückgekehrt.

Als eine kleine, für die Arbeitspraxis aber nicht ganz unwesentliche Verbesserung möchte ich eine Beschleunigung des Arbeitstempos des Lindtschen Extraktionsapparates durch intensivere Heizung erwähnen. Ich habe eine solche dadurch erzielt, daß ich die zum Erwärmen der Extraktionskölbchen dienenden Siemenschen Kochplatten mit einem Metallringe einfassen ließ und den Raum oberhalb der Kochplatte mit Eisenfeilspänen ausfüllte, in die ich die Extraktionskölbchen teilweise eingrub. Man erzielt so eine

[1]) E. Neubauer (l. c. S. 393) erwähnt, daß gleichmäßig gefütterte Kaninchen in ihrem Harne recht konstante Mengen ätherlöslicher Säuren ausscheiden; die Tagesmenge derselben entspricht bei Hunger und Milchfütterung ca. 10 ccm $^n/_{10}$-Lauge, bei Rübenfütterung 30 bis 40 ccm $^n/_{10}$-Lauge. Jedenfalls ist die Menge dieser Harnbestandteile so groß, daß sie die Acidität der kleinen im normalen Kaninchenharn vorhandenen Milchsäuremengen überdecken muß.

viel flottere und gleichmäßigere Arbeit des Extraktionsapparates, derart, daß man sich, wenn es sich nicht um chemisch-analytische Aufgaben, vielmehr um Stoffwechselanalysen handelt, mit einer 12stündigen Extraktionsdauer sehr wohl begnügen kann. Die Milchsäuremengen, die man durch weitere Extraktion etwa noch gewinnen kann, sind so minimal, daß sie neben anderen unvermeidlichen Verlusten beim Aufsammeln des Harnes und dgl. sicherlich nicht in Betracht kommen.

Schließlich möchte ich erwähnen, daß ich die durch mein Verfahren ermittelte Substanz auch im normalen Harne stets als Milchsäure in Rechnung gebracht habe, da vorderhand keine andere ätherlösliche, weder durch Baryt noch durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanz von saurem Charakter im normalen Harne bekannt ist, die bei der Permanganatoxydation Aldehyd liefert, als eben die Milchsäure. Wenn daher Joshikawa[1]), der gezeigt hat, daß man auch auf polarimetrischem Wege Milchsäure im Harne bestimmen kann, die Anwesenheit von d-Milchsäure im normalen Harne leugnet, weil er sie nicht optisch nachweisen konnte, so scheint mir dies so lange unberechtigt, als man nicht eine andere Substanz als Quelle des bei der Prozedur resultierenden Aldehyds erkannt hat. Meine Kurven zeigen alle möglichen kontinuierlichen Übergänge zwischen den minimalen Mengen aldehydliefernder Substanz in normalen und den großen Mengen derselben in pathologischen Harnen. Daß es sich aber in letzterem Falle wirklich um d-Milchsäure handelt, ist schon vor Dezennien auf dem Wege der Elementaranalyse vielfach bewiesen worden. Es liegt also sicherlich außerordentlich viel näher, anzunehmen, daß die minimalen Milchsäuremengen des normalen Harnes eben nicht optisch nachweisbar sind, vermutlich, weil sie durch andere entgegengesetzt optisch-aktive Bestandteile verdeckt werden, als sich vorzustellen, die aldehydgebende Substanz des normalen und des pathologischen Harnes seien verschiedene Dinge. Ich möchte also ein für allemal gesagt haben, daß, wenn wir die aldehydgebende Substanz bei unseren Bestimmungen als Milchsäure in Rechnung setzen, dies mit der ausdrücklichen Verwahrung ge-

[1]) S. Joshikawa (Kyoto), Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure in den Körperflüssigkeiten und Organen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 382, 1913.

schieht, daß uns vorläufig eben keine andere aldehydgebende Substanz bekannt ist, die das gleiche analytische Verhalten zeigt. Sollte man später einmal eine solche kennen lernen, so wird man sie bei Beurteilung der Versuchsergebnisse eben entsprechend in Rechnung ziehen müssen. Wenn wir wissen, daß alle Organe und Gewebe beständig d-Milchsäure produzieren und daß sich ein kontinuierlicher Strom dieser Säure in das Blut ergießt, so ist es doch wahrhaftig nicht schwer verständlich, daß minimale Mengen davon auch im Harne zum Vorschein kommen. Das Gegenteil wäre sicherlich viel schwerer zu begreifen.

Der Zucker im Harne ist stets nach dem Bertrandschen Verfahren bestimmt worden.

Die Phosphorvergiftung wurde unter Verwendung möglichst kleiner Phosphorgaben, die, in Olivenöl gelöst, subcutan beigebracht worden, eingeleitet.

Versuche.

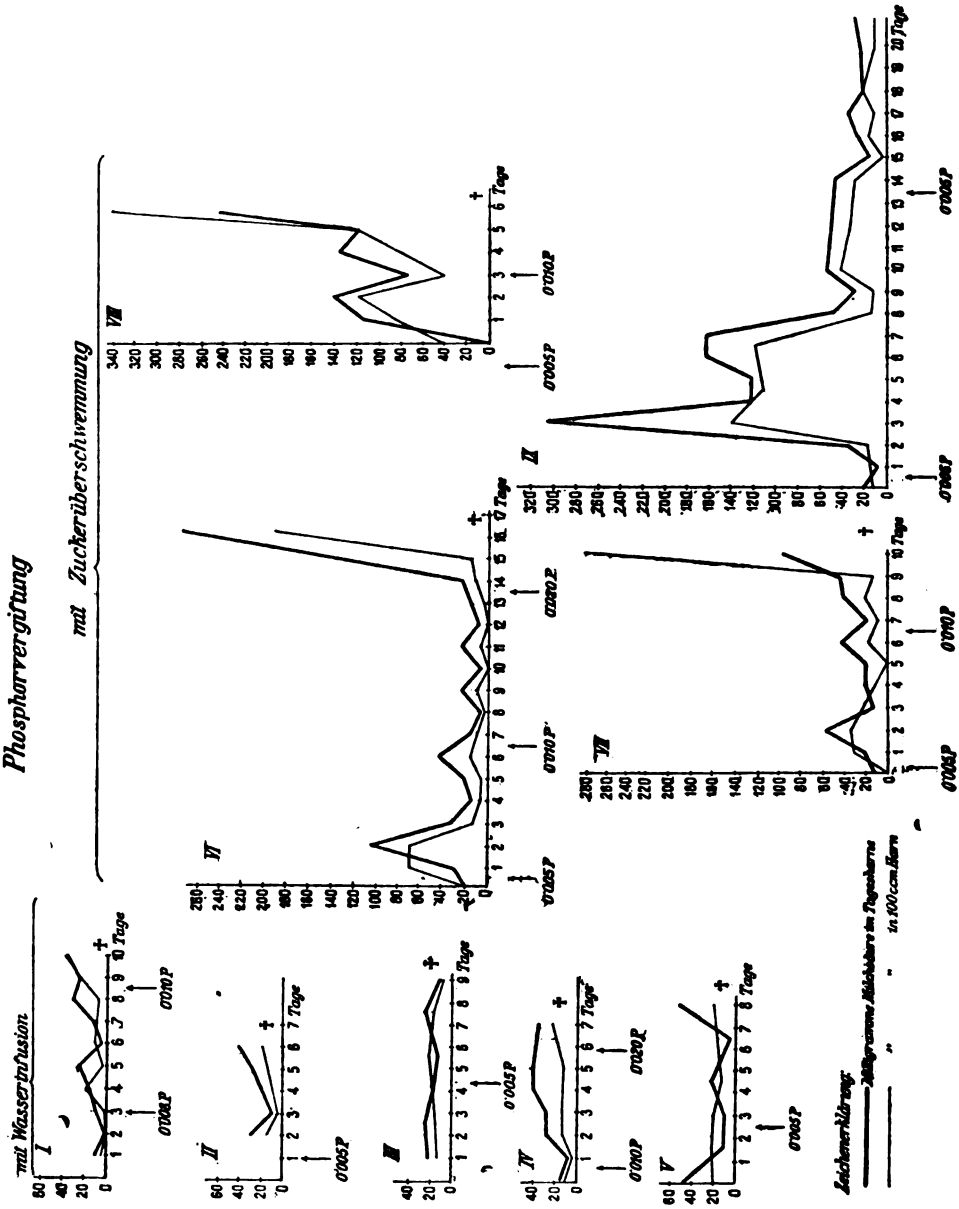
Versuch 1. (Fig. I.)

Einfache Phosphorvergiftung.

Kaninchen 3,6 kg.

Datum	Menge des Tagesharns ccm	Phosphorgabe	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Anmerkungen
3. V.	180		0,010	0,054	Keine Albuminurie.
4.	300		0	0	„ „
5.	375	0,008	0,010	0,027	„ „
6.	130		0,023	0,177	„ „
7.	60		0,003	0,040	„ „
8.	135		0,012	0,092	„ „
9.	125		0,012	0,105	„ „
10.	355	0,010	0,029	0,053	„ „
11.	125		0,023	0,195	„ „
12.	115		0,031	0,320	Albumen im Harne, Urobilin deutlich vermehrt.
13.	0				Tier tot aufgefunden. Sektion ergibt starke Verfettung der Leber und Hyperämie der Nieren.

Ein Blick auf die die Versuchsergebnisse illustrierenden Kurvenbilder Fig. I bis IV belehrt uns darüber, daß eine vermehrte Milchsäureausscheidung im Verlaufe der einfachen Phosphorvergiftung bei unserer Versuchsanordnung unerwarteterweise ausgeblieben war.


Phosphorvergiftung
mit Wasserinfusion
mit Zuckerüberschwemmung
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
IX
0·005 P
0·010 P
0·020 P
Tage
Zeichenerklärung:

Versuch 2. (Fig. II.)

Phosphorvergiftung mit Wasserinfusion.

Kaninchen 2,9 kg; erhält täglich 100 ccm Wasser per Schlundsonde.

Datum	Menge des Tagesharns ccm	Phosphorgabe	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Anmerkungen
3. VI.					
4.	205	0,005	0,028	0,140	Zucker 0, Eiweiß 0.
5.	170		0,008	0,045	„ „
6.	170		0,016	0,095	„ „
7.	230		0,025	0,110	„ „
8.	215		0,039	0,182	„ „
9.					Tier tot aufgefunden. Sektion ergibt nur stellenweise Verfettungsherde in der Leber.

Versuch 3. (Fig. III.)

Phosphorvergiftung mit Wasserinfusion.

Kaninchen, 3 kg, erhält täglich 100 ccm Wasser per Schlundsonde.

Datum	Menge des Tagesharnes ccm	Phosphorgabe	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Zucker im Harn	Eiweiß im Harn	Anmerkungen
10. VI.	320						
11.	160		0,021	0,125			
12.	160						
13.	30	0,005					
14.	82		0,012	0,178	0	0	Tier frißt reichlich.
15.	48						Nahrungsaufnahme vermindert.
16.	51		0,020	0,168	0	0	do.
17.	71						Tier verweigert die Nahrung, ist sehr schwach.
18.	94		0,009	0,080	0	0	Tot aufgefunden. Sektion ergibt keine deutliche Leberverfettung.

Ich war der Meinung, daß dieses Ausbleiben einer vermehrten Milchsäureausscheidung möglicherweise mit dem Umstande zusammenhängen könnte, daß die Tiere, sobald die Phosphorvergiftung voll einsetzt, zu fressen aufhören. Ich versuchte es daher mit der künstlichen Beibringung einer kohlenhydratfreien, aber durch ihren hohen Caloriengehalt ausgezeichneten Nahrung, indem ich einem Tiere täglich außer 70 ccm Wasser 30 ccm einer neutralen Olivenölemulsion (durch Emulgierung von Olivenöl mit der zur Neutralisation

gegen Phenolphthalein erforderlichen Menge $^{n}/_{10}$-Alkali hergestellt) per Schlundsonde beibrachte, in der Erwartung, daß zu einer Zeit, wo spontane Nahrungsaufnahme nicht mehr stattfindet, der Darm doch wohl noch befähigt sein dürfte, die Fettemulsion zu resorbieren. Doch gelang es auch so nicht, eine vermehrte Milchsäureausscheidung auszulösen:

Versuch 4. (Fig. IV.)

Phosphorvergiftung mit Wasserinfusion.

Kaninchen, 2,75 kg, erhält täglich 100 ccm Wasser per Schlundsonde.

Datum	Menge des Tages-harnes ccm	Phos-phor-gabe	Milchsäure im Tages-harn	Milchsäure im Liter	Zucker im Harn	Eiweiß im Harn	Anmerkungen
9. VII.	165	0,010	0,012	0,073			
10.	240		0,004	0,018	0	0	Tier munter, frißt gut.
11.	290		} 0,025	0,104	0	0	do.
12.	225						
13.	330	0,020	} 0,037	0,096	0	0	do.
14.	450						
15.	365		?	?			
16.	235		0,033	0,140	0	0	
17.							Tier tot aufgefunden, Leber wenig verfettet.

Versuch 5. (Fig. V.)

Phosphorvergiftung mit Infusion von Wasser und Ölemulsion.

Kaninchen, 3200 g, erhält täglich 30 ccm neutraler Olivenölemulsion und 70 ccm Wasser per Schlundsonde.

Datum	Menge des Tages-harnes ccm	Phos-phor-gabe	Milchsäure im Tages-harn	Milchsäure im Liter	Zucker im Harn	Eiweiß im Harn	Anmerkungen
18. VI.	245		0,045	0,183	0	0	
19.	95		} 0,009	0,169	0	0	
20.	120	0,005					
21.	70		0,011	0,150	0	0	Tier frißt reichlich.
22.	} 78		0,018	0,120	0	0	Tier frißt nicht.
23.							
24.	} 32		0,005	0,148	0	0	
25.							
26.	285		0,050	0,175	0	0	Tier tot aufgefunden.

Ich habe nun an die mitgeteilten 4 Versuche mit Wasserinfusion 4 ganz analog durchgeführte Parallelversuche an-

gefügt, die sich von den ersteren dadurch unterscheiden, daß die Tiere während der ganzen Versuchsdauer mit Zucker überschwemmt wurden, indem sie täglich per Schlundsonde 30 g Glucose, in 100 ccm Wasser gelöst, also ungefähr 10 g Zucker pro Kilogramm erhielten.

Versuch 6. (Fig. VI.)

Phosphorvergiftung mit Zuckerinfusion.

Kaninchen, 2970 g, erhält täglich 30 g in 100 ccm Wasser gelöst per Schlundsonde.

Datum	Menge des Tages-harnes ccm	Phos-phor-gabe	Milchsäure		Zucker im Harn	Eiweiß im Harn	Anmerkung
			im Tages-harn	im Liter			
28. VI.	275	0,005	0,015	0,053	0	0	Tier ist munter, frißt reichlich.
29.	350		0,103	0,665	0	0	do.
30.			0,030		0	0	do.
1. VII.	250		0,033	0,130	0	0	do.
2.	245		0,015	0,063	0	0	do.
3.	345		0,019	0,055	0	0	do.
4.	280	0,010	0,044	0,155	0	0	do.
5.	320		0,016	0,050	0	0	do.
6.	200		0,007	0,030	0	0	do.
7.	255		0,024	0,095	1,535	0	do.
8.	245		0,005	0,025	1,813	0	do.
9.	240		0,025	0,099	0,378	0	do.
10.	295	0,020	0,005	0,018	0	0	do.
11.	220		?	?	0	0	do.
12.	185		?	?	0	0	do.
13.	330		0,025	0,075	0	vor-handen	do.
14. „	135		0,215	1,593	3,888	do.	
15. „							Tier wird tot aufgefunden. Leber hochgradig verfettet.

Betrachten wir nunmehr die graphische Registrierung der Resultate dieses Versuchs (Fig. 6), so sehen wir, daß hier in der Tat erzielt wurde, was wir bei der Phosphorvergiftung mit Wasserinfusion niemals erzielt hatten, nämlich eine zweifellose Erhöhung der Milchsäureausscheidung. Dieselbe war nicht etwa so hochgradig und ausgiebig, daß man auf die Idee verfallen könnte, ein erheblicher Teil des aufgenommenen Zuckers sei in Michsäure umgeformt worden. Davon ist auch nicht im allerentferntesten die Rede. Auch nach Beginn der Phosphorvergiftung schied das Versuchs-

tier an den meisten Versuchstagen nur jene minimalen Mengen aldehydgebender Substanz aus, die wir auch im normalen Harne anzutreffen gewohnt sind. Nur an 2 Versuchstagen war die Milchsäureausscheidung zweifellos vermehrt: an jenem Tage, der der ersten Phosphorinjektion unmittelbar folgte, und dann erst wieder an jenem Tage, wo das agonale Stadium eintrat.

Während der ganzen dazwischenliegenden Periode war von einer vermehrten Milchsäureausscheidung nichts zu merken, trotzdem das Tier täglich 30 g Zucker aufgenommen und assimiliert hatte. Daß letzteres auch wirklich der Fall gewesen war, geht aus dem Umstande hervor, daß während des größeren Teiles des Versuchs kein Zucker in den Harn übertrat. Nur nach der zweiten Phosphorinjektion trat während dreier Tage Zucker im Harn auf, um dann wieder zu verschwinden; erst im agonalen Stadium wurde dann wieder ein sehr zuckerreicher Harn ausgeschieden. Ein Parallelismus zwischen Milchsäure- und Zuckerausscheidung war, was beachtenswert ist, hier sicherlich nicht vorhanden: nach der ersten Phosphorinjektion erfolgte Milchsäureausscheidung ohne Glucosurie, nach der zweiten Phosphorinjektion umgekehrt Glucosurie ohne vermehrte Milchsäureausscheidung.

Versuch 7. (Fig. VII.)

Phosphorvergiftung mit Zuckerinfusion.

Kaninchen, 3080 g, erhält täglich 30 g Dextrose in 100 ccm Wasser gelöst per Schlundsonde.

Datum	Menge des Tagesharnes ccm	Phosphorgabe	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Zucker im Harn	Eiweiß im Harn	Anmerkungen
28. VI.	100	0,005	0,012	0,120	0	0	
29. 30.	} 260		0,044	0,340	0	0	Tier frißt reichlich.
1. VII.	84		0,019	0,220	0	0	do.
2.	260		0,022	0,150	0	0	do.
3.	380		0,023	0,060	0	0	do.
4.	220	0,010	0,059	0,270	0	0	do.
5.	345		0,020	0,055	0	0	do.
6.	195		0,043	0,215	0	vorhanden	Tier frißt wenig.
7.	295		0,047	0,156	0	do.	do.
8.	45		0,097	2,155	reichlich	do.	do.

Anm.: Tier wird tot aufgefunden; seine Leber erscheint nur mäßig verfettet. Gewicht des Tieres hat von 3080 g auf 2800 g abgenommen.

Die Zuckerinfusionen hatten in dem Versuch VI allem Anscheine nach lebensverlängernd gewirkt: während in den 5 vorangehenden Versuchen die Tiere im Laufe einer Woche der Phosphorvergiftung erlegen waren, war unser Versuchstier noch nach 2 Wochen munter und freßlustig geblieben, um erst nach einer weiteren größeren Phosphordosis schließlich zugrunde zu gehen.

Bei dem Versuch VII hat die Milchsäureausscheidung bis zum Einsetzen der Agonie kaum merklich zugenommen; es ist nur eben die Andeutung einer solchen Vermehrung vorhanden. Da im terminalen Stadium die Nierentätigkeit offenbar frühzeitig zum Stillstande gelangt war, ist die absolute Menge ausgeschiedener Milchsäure auch hier keine große; imposant erscheint hier nur der terminale Anstieg der Milchsäurekonzentration im Harn, der in diesem Falle mit dem Einsetzen der Glucosurie Hand in Hand geht.

Augenfälliger erscheint der Effekt der Zuckerinfusion in dem nachfolgenden Versuche:

Versuch 8. (Fig. VIII.)

Phosphorvergiftung mit Zuckerinfusion.

Kaninchen 3 kg; erhält täglich 30 g Dextrose in 100 ccm Wasser gelöst pro Schlundsonde.

Datum	Menge des Tages-harns ccm	Phos-phor-gabe	Milchsäure		Zucker im Harn	Eiweiß im Harn	Anmerkungen
			im Tages-harn	im Liter			
15. V.	42	0,005	—	—			
16.	58		0,021	0,362	0	spurenw.	
17.	140		0,115	0,821	0	„	
18.	120		0,140	1,166	0	0	
19.	170		0,065	0,385	0	0	
20.	?	0,010	0,134	?	0	0	
21.	100		0,114	1,140	0	vorhand.	
22.	70		0,242	3,462	sehr reichlich	„	
23.							Tier tot aufgefunden. Leber fettig degeneriert.

Hier stieg die Milchsäureausscheidung schon am 2. Tage der Phosphorvergiftung ziemlich hoch über die Norm empor, ohne diese später wieder zu erreichen. Der terminale Anstieg war hier ein beträchtlicher, der zeitliche Ablauf der Vergiftung ein beschleunigter.

Einen ganz anderen Kurvenverlauf zeigt wiederum der nächste Versuch:

Versuch 9. (Fig. IX.)

Phosphorvergiftung mit Zuckerinfusion.

Kaninchen 2800 g, erhält täglich 30 g Dextrose in 100 ccm Wasser gelöst pro Schlundsonde.

Datum	Menge des Tages-harns ccm	Phos-phor-gabe	Milchsäure im Tages-harn	Milchsäure im Liter	Zucker im Tages-harn	Eiweiß im Harn	Anmerkungen
4. VI.	170	0,005	0,023	0,135	0	0	
5.	65		0,009	0,146	0	0	Tier frist gut.
6.	180		0,033	0,185	0	0	do.
7.	220		0,305	1,387	0	0	do.
8.	131		0,120	0,920	1,042	+	Tier verweigert die Nahrung.
9.							
10.	135		0,162	1,203	1,957	+	do.
11.							
12.	140		0,045	0,163	0,213	+	Tier hat sich erholt, frißt gut.
13.							
14.	195		0,028	0,140	?	+	do.
15.	132		0,054	0,409	0	0	do.
16.							
17.	147	0,005	0,047	0,315	0,444	0	do.
18.							
19.	170		0,047	0,277	0,542	0	do.
20.	230		0,018	0,047	0,608	0	do.
21.	175		0,027	0,155	0,315	0	do.
22.	270		0,031	0,177	0,216	0	do.
23.	105		0,022	0,215	Spuren	0	do.
24.	305		0,022	0,085	„	0	do.
25.							
26.	210		0,024	0,116	„	0	do.

Versuch wurde abgebrochen. 12 Tage später wurde das Tier tot aufgefunden.

Wir sehen bei diesem Versuche schon 2 Tage nach Beibringung der ersten Phosphordosis eine mächtige Milchsäureausschüttung erfolgen, die von einer schweren Störung des Allgemeinbefindens, Nahrungsverweigerung, alimentärer Glucosurie und Albuminurie begleitet ist und die im Laufe einer Woche, während das Tier sich erholt, abklingt. Merkwürdigerweise blieb nach einer Wiederholung der Phosphorinjektion jede weitere Milchsäureausschüttung, allerdings auch jede auffallende Störung des Allgemeinbefindens des Tieres, aus.

Überblicken wir nunmehr die vorliegenden Versuchsreihen, so gelangen wir zu folgendem Ergebnisse:

Es erscheint zweifellos festgestellt, daß die Milchsäureausscheidung durch die Überschwemmung des Organismus der Versuchstiere mit Zucker beeinflußt und gefördert wird, insofern wir bei unserer Versuchsanordnung bei den Versuchen mit einfacher Wasserüberschwemmung eine Steigerung der Milchsäureausscheidung im Anschluß an die Phosphorvergiftung ganz vermißt hatten, während eine solche bei den zuckerüberschwemmten Tieren, sei es im unmittelbaren Anschluß an die Phosphorinjektion, sei es erst im terminalen Stadium, stets zu beobachten war.

Der Gedanke, daß in den Harn übergegangener Zucker etwa erst daselbst in Milchsäure umgewandelt worden sein könnte, wird durch den Umstand widerlegt, daß ein Parallelismus zwischen Lactacidurie und alimentärer Glucosurie keineswegs besteht und daß erstere ihren Höhepunkt erreichen kann, ohne daß eine Glucosurie überhaupt aufgetreten ist. Übrigens habe ich bakterielle Vorgänge, soweit dies überhaupt praktisch möglich ist, durch Auffangen des Harnes unter Toluol, ausgeschlossen.

Wenn also hier ein Zusammenhang zwischen Lactacidurie und Zuckerüberschwemmung auch gegeben erscheint, so möchte ich doch die Frage, ob ich diesen Zusammenhang für einen direkten und unmittelbaren halte, nicht ohne weiteres bejahen. Es will mir vielmehr scheinen, daß wenn sich de Zucker wirklich direkt und unmittelbar (in dem Sinne etwa wie dies bei der bakteriellen Entstehung der Gärungsmilchsäure der Fall ist) in Milchsäure umwandeln würde, sich die Ausscheidung desselben bei den mit Zucker überschwemmten Phosphortieren denn doch wohl in weit größerem Umfange und mit weit größerer Regelmäßigkeit vollziehen müßte, als dies tatsächlich der Fall ist. Wird doch selbst günstigstenfalls nur ein minimaler Bruchteil des zugeführten Zuckers in Form von Milchsäure an die Oberfläche des Stoffwechsels befördert. Allerdings kann man dagegen die Einwendung erheben, daß nach den Beobachtungen von J. Parnas in den Organismus von Kaninchen eingeführte Rechtsmilchsäure selbst bei der

Darreichung größerer Mengen fast vollständig verbrannt wird[1]). Immerhin meine ich, daß obige Versuche den Eindruck erwecken, als ob der Übergang des Zuckers in Milchsäure im Organismus kein unmittelbarer, vielmehr vom wechselnden Auftreten intermediärer Umsetzungen bedingt wäre, wobei man, als an eine Phase dieser Umsetzungen, an das Auftreten des „Lactacidogens" nach Embden, als unmittelbarer Vorstufe der Milchsäure zu denken hätte.

Unter den intermediären Stoffwechselprodukten, die beim Übergang des Zuckers in Milchsäure in Betracht kommen, stehen gegenwärtig der Glycerinaldehyd, die Brenztraubensäure und das Methylglyoxal im Vordergrunde des Interesses. Es wäre daher sicherlich logisch, den Einfluß dieser Verbindungen auf die Milchsäureausscheidung beim phosphorvergifteten Tiere in analoger Weise zu prüfen, wie dies mit dem Traubenzucker geschehen ist. Ich habe bisher einen derartigen Versuch mit dem erstgenannten der Produkte, mit dem Glycerinaldehyd, durchgeführt.

Ich habe mich zunächst durch einen Vorversuch darüber orientiert, ob der Glycerinaldehyd nicht etwa bei der Permanganatoxydation in saurer Lösung, ähnlich wie die Milchsäure, reichlich Aldehyd liefert. Ich habe daher 2 ccm Glycerinaldehyd (Schuchardt) mit 200 ccm H_2SO_4 1% in den Destillationskolben des Milchsäurebestimmungsapparates eingebracht und die Destillation in gewöhnlicher Weise unter Zutropfen von $^n/_{10}$-Permanganatlösung vorgenommen. Da etwas freies Brom (von der Herstellung des Präparats herrührend) in das Destillat übergegangen war, wurde dasselbe mit Natronlauge eben alkalisch gemacht, neuerlich destilliert und im Destillat in gewöhnlicher Weise die Bisulfitaddition titrimetrisch bestimmt. Diese entsprach, auf Milchsäure umgerechnet, 0,02 g derselben, was praktisch kaum in Betracht käme.

Ich habe weiterhin 150 ccm normalen Kaninchenharns mit 5 ccm Glycerinaldehyds versetzt und die Bestimmung der Milchsäure nach Ätherextraktion in gewöhnlicher Art vorgenommen. Die resultierende Aldehydmenge entsprach nur 4,1 ccm $^n/_{10}$-Jod, diejenige in einer Parallelprobe desselben Harnes ohne Glycerinzusatz 4,2 ccm $^n/_{10}$-Jod.

Ich konnte also beruhigt an meinem Versuch herangehen, ohne befürchten zu müssen, daß mir etwa ein Übergang unveränderten Glycerinaldehyds in den Harn das Auftreten von Milchsäure vortäuschen könnte.

---

[1]) J. Parnas, Über das Schicksal der stereoisomeren Milchsäuren im Organismus des normalen Kaninchens. Diese Zeitschr. **38**, 53, 1912.

So habe ich denn versucht, den Organismus eines phosphorvergifteten Kaninchens mit Glycerinaldehyd (einer wenig giftigen Verbindung) zu überschwemmen. Da ich keinerlei Garantie dafür besaß, daß vom Darme aus aufgenommener Glycerinaldehyd noch als solcher unverändert in die Zirkulation gelange, habe ich es vorgezogen, die Substanz, erst mit Wasser verdünnt (5 g Glycerinaldehyd + 15 H_2O), dann aber in Dosen von 20 ccm unverdünnt subcutan (durch kurzandauerndes Aufkochen sterilisiert) beizubringen.

Versuch 10.

Phosphorvergiftung mit Beibringung von Glycerinaldehyd.

Kaninchen 4550 g.

Datum	Menge des Tagesharns ccm	Phosphorgabe	Glycerinaldehydgabe	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Anmerkungen
15. X.	?			0,052	?	
16.						
17.	150		Glycerinaldehyd 5,0 + 15 H_2O	0,013	0,081	
18.	210	0,010		0,015	0,072	
19.	284		Glycerinaldehyd 5,0 + 15 H_2O	0,041	0,108	
20.	370			0,031	0,085	
21.	—			0,018	0,105	
22.	164		Glycerinaldehyd 5,0 + 15 H_2O	0,023	0,281	
23.			Glycerinaldehyd 5,0 + 15 H_2O			
24.	258			0,058	0,225	
25.	130	0,010	Glycerinaldehyd 20,0	0,064	0,493	
26.	210			0,060	0,301	
27.	200			0,020	0,100	
28.	350			0,035	0,100	
29.	322		Glycerinaldehyd 20,0	0,035	0,110	
30.	292			0,017	0,065	
31.	360			0,067	0,185	
1. XI.	280	0,020	Glycerinaldehyd 0,20	0,031	0,110	Harn eiweißfrei, nicht reduzierend.
2.	222			0,060	0,270	
3.						Tier wird tot aufgefunden. Sein Gewicht hat von 4550 g auf 3650 g abgenommen. Leber hochgradig verfettet; Niere nicht auffallend verändert.

Was nun die Deutung dieses Versuches betrifft, kann ich denselben nicht anders denn als negativ bezeichnen. Man beachte, daß der Milchsäurewert des Harnes hier bereits vor jedem Eingriffe etwas größer war, als wir ihn sonst zu finden gewohnt sind (was vielleicht mit der Übertragung des Tieres in den ungewohnt engen Stoffwechselkäfig zusammenhängen mag), daher ich auch auf die geringfügigen Erhebungen der Kurve keinen Wert legen möchte. Jedenfalls war hier von einer wirklichen Massenausscheidung von Milchsäure gar keine Rede.

Wäre eine solche erfolgt, so hätten wir sie immerhin als für einen Übergang von Glycerinaldehyd in Milchsäure im lebenden Organismus beweisend ansehen dürfen. Doch glaube ich nicht, daß man umgekehrt einen negativen Versuch dieser Art als Gegenbeweis gegen einen solchen Übergang voll anerkennen darf. Denn wer garantiert uns dafür, daß in die Blutbahn von außen eingebrachter Glycerinaldehyd sich wirklich so verhalte und verhalten müsse, wie etwa jener Glycerinaldehyd, der „in statu nascendi" durch die Arbeit lebender Organzellen möglicherweise aus dem Zucker abgespalten wird? Ich meine, daß man allen Grund hat, bei der Deutung derartiger negativer Stoffwechselversuche vorsichtig zu Werke zu gehen!

Einen analogen Versuch mit der Brenztraubensäure habe ich vorläufig unterlassen, weil ich gesehen hatte, daß diese bei der Permanganatoxydation im Destillat ziemlich reichlich jodbindende Substanzen liefert und es besonderer Vorversuche bedurft hätte, um eine Trübung der Versuchsresultate durch den eventuellen Übergang von Brenztraubensäure neben Milchsäure in den Harn mit Sicherheit auszuschließen. Hier könnte die polarimetrische Methode gute Dienste leisten.

Dagegen hat mich eine Anregung des Herrn Kollegen G. Embden[1]) veranlaßt, festzustellen, ob nicht vielleicht die Beibringung von Hexosephosphorsäure bei phosphorvergifteten Tieren eine auffallende Vermehrung der Milchsäureausscheidung hervorzurufen vermöge. Embden hat nämlich, ausgehend von einer Beobachtung, derzufolge ein gewisser Parallelismus zwischen postmortaler Milchsäurebildung und dem

[1]) Diskussionsbemerkung G. Embdens zu meinem Vortrage auf dem IX. internat. Physiologenkongreß in Groningen.

Auftreten freier Phosphorsäure in den Geweben zu bestehen schien[1]), den bestechenden Gedanken geäußert, daß vielleicht die esterartigen Verbindungen zwischen Zucker und Phosphorsäure, denen neueren Forschungen entsprechend bei den Vorgängen der alkoholischen Gärung eine wichtige Rolle zuzufallen scheint, auch bei den Vorgängen der Milchsäurebildung im Organismus in ähnlich bedeutsamer Weise beteiligt sein könnten[2]).

Um nun in den Besitz eines derartigen Kohlenhydratphosphorsäureesters zu gelangen, ließ ich, wie es zuerst Iwanoff angegeben, dann Lebedew, Harden und Young sowie Euler vielfach geübt haben, Hefenpräparate auf eine Mischung von Zucker und Alkaliphosphat einwirken. Bei der Gärung entsteht eine durch Magnesiamischung nicht mehr fällbare organische Phosphorverbindung, die meist als Hexosediphosphorsäure $C_6H_{10}O_4(PO_4Na_2)_2$ gedeutet wird. Versetzt man abgemessene Mengen der Gärflüssigkeit mit Magnesiamischung und schätzt die Menge des Trippelphosphatniederschlags nach der Höhe des Sedimentes in einem graduierten Zylinder, so gibt das einen brauchbaren und sehr bequemen Maßstab, um den Fortgang des Veresterungsvorganges zu verfolgen. Ich habe nach mannigfachen Vorversuchen folgenden Vorgang eingehalten: In 1250 ccm einer Lösung, die 5% Glucose sowie 5% Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 + 2H_2O$) enthielt, wurden 80 g des Hefendauerpräparates „Zymin" (von der Firma Schroder in München hergestellt) verteilt. Nachdem die Suspension über Nacht bei Zimmertemperatur der Gärung überlassen worden war, waren schätzungsweise etwa $^3/_4$ der anorganischen Phosphorsäure in eine durch Magnesiamixtur nicht mehr fällbare Form übergegangen. Es wurde nunmehr alles koagulable Eiweiß durch Aufkochen entfernt, das Filtrat im Vakuum bei ca. 80° derart eingeengt, daß es ca. 8% Hexosediphosphorsäure enthielt. Von dieser (durch Aufkochen sterilisierten) Lösung habe ich einem Kaninchen 40 ccm (mit einem Gehalte von etwa 3 g Hexosediphosphorsäure) subcutan beigebracht. Da bei einem Vorversuche das Versuchstier schon innerhalb eines Tages allem Anscheine nach an Säurevergiftung infolge Freiwerdens von Phosphorsäure zugrunde gegangen war, habe ich zugleich mit der Hexosephosphorsäure soviel Natriumbicarbonat injiziert (6 g), daß man mit Sicherheit auf die Neutralisation freiwerdender Phosphorsäure rechnen konnte.

---

[1]) Vgl. näheres darüber bei Neuberg, Der Zuckerumsatz der Zelle. Handb. d. Biochem., Ergänzungsband S. 579ff.

[2]) Die Existenz eines solchen Parallelismus ist allerdings kürzlich von Parnas (Münch. med. Wochenschr. **1913**, Nr. 8, S. 448; Sitzungsber. des Naturw. med. Vereins in Straßburg; vgl. auch J. Parnas und R. Wagner, diese Zeitschr. **56**, 426, 1914) geleugnet worden.

Versuch 11.

Phosphorvergiftung mit Beibringung von Hexosephosphorsäure.

Kaninchen, 3760 g.

Tag	Harnmenge ccm	Injektion	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Anmerkungen
1.	372		0,022	0,060	
2.	230		0,021	0,091	
3.	180		0,023	0,105	
4.	340		0,025	0,075	
5.	366		0,035	0,050	
6.	504	Phosphor 0,010 g u. Hexosephosphorsäure ca. 3 g	0,070	0,140	
7.	72		0,040	0,555	
8.	58		0,045	0,776	
9.					Kaninchen tot aufgefunden. Leber mäßig verfettet.

Eine Vermehrung der Tagesausscheidung von Milchsäure ist hier infolge Darniederliegens der Nierentätigkeit und der Verminderung der Harnmenge überhaupt nicht zur Beobachtung gelangt und nur eine mäßige Steigerung der Milchsäurekonzentration im Harn deutet einen Effekt an, der aber durch die Zuckerkomponente der eingeführten Hexosephosphorsäure als solche ganz ausreichend erklärt erscheint.

Wir werden uns also vorläufig mit der Feststellung zu begnügen haben, daß bei einer Versuchsanordnung, die beim phosphorvergifteten Kaninchen an sich keine vermehrte Milchsäureausscheidung in Erscheinung treten ließ, eine solche in ausgeprägter und unzweifelhafter Weise zum Vorscheine gekommen ist, sobald der Organismus der Versuchstiere mit Zucker überschwemmt worden war.

Zusammenfassung.

1. Im Harn mittelgroßer, mit Grünfutter ernährter, mit Phosphordosen von 0,005 bis 0,020 vergifteter Kaninchen wurde im ganzen Verlaufe der letal endigenden Intoxikation jede vermehrte Milchsäureausscheidung vermißt.

2. Dagegen trat eine solche in ausgeprägter und unzweifelhafter Weise in Erscheinung, wenn der Organismus der Ver-

suchstiere im Verlaufe der Vergiftung durch tägliche Infusion von 30 g Glucose (gelöst in 100 ccm Wasser) mit Zucker überschwemmt worden war. Die Milchsäureausscheidung erfolgte entweder im Anschluß an die Beibringung des Giftes oder aber erst im terminalen Stadium der Vergiftung.

3. Der Verlauf der Milchsäure-Ausscheidungskurven sowie der Umstand, daß die im Harn zum Vorschein kommenden Milchsäuremengen unter allen Umständen nur einen geringen Bruchteil der gleichzeitig umgesetzten Zuckermengen darstellen, erweckt den Eindruck, als ob der Übergang des Zuckers in Milchsäure im Organismus kein unmittelbarer wäre (in dem Sinne etwa, wie dies bei der bakteriellen Entstehung der Gärungsmilchsäure der Fall ist), als ob er vielmehr mit dem wechselnden Ablauf gewisser intermediärer Umsetzungen zusammenhängen würde, wobei an das Auftreten eines „Lactacidogens" im Sinne Embdens zu denken wäre.

4. Ein Zusammenhang der Lactacidurie mit alimentärer Glucosurie war nicht wahrzunehmen; vielmehr konnte Lactacidurie ohne alimentäre Glucosurie sowie auch das Umgekehrte beobachtet werden.

5. Nach parenteraler Beibringung von Glycerinaldehyd wurde keine Lactacidurie beobachtet. Nach Beibringung von Zucker, der durch die Vorgänge der Hefegärung an Phosphorsäure gebunden worden war, wurde zwar vermehrte Lactacidurie bemerkt, aber nicht in einem Umfange, der nicht durch die Zuckerkomponente ausreichend erklärt würde.

Über die Beziehungen der Milchsäure zum Kohlehydratstoffwechsel.

II.

Über die Milchsäureausscheidung im Harne abgekühlter Kaninchen.

Von

Otto von Fürth.

(Eingegangen am 7. Mai 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Im Verlaufe der Untersuchungen, deren Resultate in der vorangehenden Abhandlung mitgeteilt worden sind, bin ich mir darüber ins klare gekommen, daß eine Methode, wie es diejenige der Phosphorvergiftung ist, für ein eingehendes Studium der feineren Beziehungen der Milchsäure zum Kohlenhydratstoffwechsel nicht ausreicht und nicht ausreichen kann. Ist doch die Lactacidurie in diesem Falle eine Teilerscheinung eines komplizierten und an sich mangelhaft erforschten Symptomenkomplexes im Verlaufe einer letal ausgehenden Vergiftung. Will man in einem solchen Falle, wo ja eine Restitutio ad integrum von vornherein ausgeschlossen erscheint, noch die Wirkung eines superponierten Faktors (z. B. einer Zuckerinfusion) studieren, so bedarf es, wie wir ja gesehen haben, langwieriger Parallelversuche an einer ganzen Reihe von Kontrolltieren, bei denen man überdies mit Rücksicht auf individuelle Varianten nicht mit voller Sicherheit wissen kann, ob sie denn wirklich auf denselben Eingriff in genau der gleichen Weise reagiert hätten.

Ich machte mich also auf die Suche nach einem Eingriffe, der mit einiger Sicherheit die Erscheinung der Lactacidurie herbeiführt, dabei aber den Organismus nicht dauernd derart schädigt, daß man nicht hinterher auf eine Restitutio ad in-

tegrum rechnen könnte, nach einem Eingriffe also, der derart beschaffen ist, daß man ihn an ein und demselben Tiere beliebig oft und unter Superposition weiterer experimenteller Faktoren wiederholen kann.

Als ein solcher Eingriff hat sich mir nun die künstliche Abkühlung ergeben.

Schon vor mehr als 20 Jahren hat Hoppe-Seyler[1]) die Lehre vertreten, die Milchsäurebildung im tierischen Organismus sei ein anoxybiotischer Prozeß, der sich bei Anwesenheit von Zucker und bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff wahrscheinlich in jedem lebenden Protoplasma abspiele. Die Milchsäure sei ebenso auf die Spaltung von Kohlenhydraten zurückzuführen, wie etwa Mikroorganismen aus Zuckerarten bei Sauerstoffmangel Milchsäure zu erzeugen vermögen. Im Zusammenhange mit dieser Auffassung hat nun Araki[2]) das Auftreten von Milchsäure bei verschiedenen Vergiftungen (mit Phosphor, Arsen, Curare, Strychnin, Morphin, Kohlenoxyd, Amylnitrit usw.) sowie bei der Erstickung auf das gemeinsame Moment des Sauerstoffmangels zurückgeführt. Auch bei künstlicher Abkühlung von Hunden und Kaninchen (durch Bedecken mit Schnee oder Eintauchen in Eiswasser) wurde von Araki neben Albuminurie und Glucosurie das Auftreten von Milchsäure im Harn wahrgenommen, und (da dabei die Atemzüge seltener und oberflächlicher wurden) als Folge von Sauerstoffmangel gedeutet.

Ich habe mich nun zunächst davon überzeugt, daß Kaninchen auf kurzdauernde Abkühlung auf 25 bis 30°, die durch Eintauchen des auf einem Rahmen in Rückenlage mit erhöhtem Oberleib fixierten Tieres in kaltes Wasser (unter genauer Kontrolle der Temperatur durch ein in das Rectum eingeführtes Thermometer) erzielt wurde, tatsächlich mit einer ausgesprochenen Lactacidurie zu reagieren pflegen.

Es wurde weiterhin festgestellt, daß Tiere, die im normalen Ernährungszustande erhalten wurden, auf eine in nicht allzu

[1]) F. Hoppe-Seyler, Beiträge zur Kenntnis des Stoffwechsels bei Sauerstoffmangel. Festschr. zu Virchows Jubiläum. Ref. Jahresb. f. Tierschau 22, 385, 1892.

[2]) T. Araki, Über die Bildung von Milchsäure und Glykose im Organismus bei Sauerstoffmangel. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 333 1891; 16, 453, 1892.

geringen Intervallen wiederholte Abkühlung immer wieder mit Milchsäureausschüttung reagierten.

Ich habe mich schließlich davon überzeugt, daß, wenn man bei ein und demselben Tiere Perioden der Zuckerüberschwemmung und der künstlichen Kohlenhydratverarmung (durch Kombination von wiederholten Adrenalininjektionen mit Hunger erzeugt) abwechseln läßt, das Tier nur in ersterem Falle auf den Abkühlungsreiz mit Milchsäureausschüttung reagiert.

Es dürfte jedoch nicht überflüssig sein, wenn ich, bevor ich auf meine Hauptversuche eingehe, auch meiner Fehlversuche und der Vorsichten, die man bei Abkühlungsversuchen an Kaninchen wohl zu beachten hat, kurz gedenke, um denjenigen, die etwa in Zukunft diesen Weg stoffwechselphysiologischer Forschung zu beschreiten geneigt sein mögen, Mißerfolge und Zeitverluste zu ersparen.

Der Einfluß der Abkühlung auf die Vorgänge der Wärmeregulierung, auf den Verlauf der Temperaturkurve, sowie auf die Zirkulation und Respiration ist von zahlreichen älteren Autoren zum Gegenstande eingehender Studien gemacht worden[1]).

Weit unvollständiger sind die uns hier in erster Linie interessierenden Angaben über den Einfluß der Abkühlung auf die Vorgänge des Stoffwechsels.

Mathieu und Urbain[2]) beobachteten bei ihren Gasanalysen am abgekühlten Tiere trotz Herabsetzung der Verbrennungsvorgänge eine Kohlensäureanhäufung im Blute, da die Elimination der Kohlensäure hinter der Produktion zurückblieb. Gerade umgekehrt stellte Quinquaud[3]) fest, daß die Herabsetzung der Verbrennungsvorgänge in den

[1]) Vgl. insbes. die Arbeiten von A. Walther, Virchows Archiv **25**, 414, 1862; B. Beck, Deutsche Klinik **1868**, 53, 63, 72; G. Wertheim, Wiener med. Wochenschr. **1870**, Nr. 19, 20, 21; A. Horvath, Arch. f. d. ges. Physiol. **12**, 278, 1876; R. Boehm und F. A. Hoffmann, Arch. f. experim. Pathol. **8**, 275, 1878; P. Bert, Compt. rend. Soc. Biol. **1885**, 567; R. Winternitz, Arch. f. experim. Pathol. **33**, 286, 1899; Ph. Knoll, ibid. **36**, 305, 1895; E. Fischl, Zeitschr. f. Heilk. **18**, 324, 1897; J. Lefèvre, Compt. rend. Soc. Biol **1897**, 278 und Arch. de Physiol. [5], **10**, 685, 1898; Maurel, Compt. rend. Soc. Biol. **1901**, I, 176; Lagriffe und Maurel, ibid. u. a.

[2]) Mathieu und Urbain, Des Gaz du Sang. Arch. de Physiol. **4**, 457, 1871/72.

[3]) Ch. E. Quinquaud, De l'influence du froid et de la chaleur sur les phénemènes chimiques de la respiration et de la nutrition élémentaire. Journ. de l'Anat. et de la Physiol. **24**, 326, 1887. Vgl. auch: Compt rend. **104**, 1542, 1887.

Geweben eine „Suroxygénation progressive" des arteriellen Blutes herbeiführt, die im Moment des Todes einer maximalen Sauerstoffsättigung des Blutes gleichkommen kann. Nach Herter[1]) soll die Reduktion von Methylenblau in den Geweben abgekühlter Tiere langsamer und in geringerem Grade erfolgen als in der Norm.

Nachdem schon Quinquaud darauf aufmerksam gemacht hatte, daß schnelle Abkühlung bei Kaninchen zu Hyperglykämie und Glucosurie führen kann, hat Araki, wie schon erwähnt, das Auftreten der Milchsäure bei unterkühlten Tieren beobachtet. Gläßner[2]) hat bei Menschen, die einen Selbstmordversuch durch Sprung ins Wasser unternommen hatten, die Abkühlungsglucosurie regelmäßig mit dem Auftreten von Milchsäure im Harn vergesellschaftet gefunden und auf eine Kombination von Sauerstoffmangel mit abnorm gesteigerter Muskeltätigkeit zurückgeführt. Löwit[3]) kommt bei seinen Studien über den Kältediabetes der Frösche zum Resultate, daß Pflügers Auffassung, derzufolge Herabsetzung der Temperatur zu einer Oxydationsverminderung des Zuckers beim Warmblüter führe, auch für die Kaltblüter gelte, daß aber auch eine Schädigung der Nierendichtigkeit dem Blutzucker gegenüber bei der Abkühlungsglucosurie eine Rolle spiele. Der Einfluß der Abkühlung auf die Zuckerausscheidung pankreasloser Hunde ist in letzter Zeit vielfach studiert worden[4]).

Die Nierentätigkeit kann durch die Abkühlung anscheinend je nach Umständen sowohl herabgesetzt als auch gesteigert werden. Zuweilen ist im Anschluß an die Temperaturherabsetzung Polyurie mit vermehrter Ausscheidung des Harnstoffs und der anorganischen Harnbestandteile, gelegentlich auch Albuminurie bemerkt worden[5]).

Ich habe nun, in Übereinstimmung mit den Angaben älteren Autoren, die Erfahrung gemacht, daß für Kaninchen eine Körpertemperatur von etwa 30° insofern als kritisch bezeichnet werden muß, als eine kurzdauernde Unterkühlung unter diese Grenze das Leben gefährdet. Die Tiere sind dann eben nicht immer spontan imstande, ihren Wärmeregulierungsmechanismus in dem Umfang in Gang zu bringen als notwendig

---

[1]) C. A. Herter, On the reducing action of the animal organism under the influence of cold. Amer. Journ. of Physiol. **12**, 128, 1905.

[2]) K. Gläßner, Wiener klin. Wochenschr. **1906**, Nr. 30 und **1909** Nr. 26.

[3]) M. Löwit, Diabetesstudien. Arch. f. experim. Pathol. **69**, 1, 1908.

[4]) Lüthje, Allard, Embden, Lüthje und Liefmann u. a.

[5]) Vgl. C. Delezennes, Arch. f. Physiol. **26**, 446, 1895; C. Chabrié und A. Dissard, Compt. rend. Soc. Biol. **45**, 897, 1893; G. Rem-Picci, Bolletino della R. Accad. med. di Roma **27**, 1901; zit. n. Jahresber. f. Tierchem. **31**, 820, 1901; Ch. Dubois und P. Butruille, L'Echo méd. du Nord **11**, 253; zit. n. Jahresber. f. Tierchem. **37**, 315, 1907.

wäre, um ein weiteres Absinken der Temperatur zu verhindern. Einige Beispiele mögen dies illustrieren:

a) Kaninchen von 2 kg. Durch ein kaltes Bad von 8° wird die Rectaltemperatur im Verlaufe von 14 Min. von 39,2° auf 27,0° herabgedrückt. Erst nach Unterbrechung des Bades setzt Muskelzittern ein. Am nächsten Tage wird das Tier tot aufgefunden.

b) Kaninchen von 2,2 kg. Temperatur des am Rahmen aufgebundenen Tieres vor dem Bade 38,0°, Um 5 Uhr 44 Min. Beginn des Bades von 7 bis 8°. Die Rectaltemperatur (Thermometer ständig im Rectum) beträgt um:

5h 45′	38,0°	
46	36,9°	
47	36,5°	
48	36,1°	
49	37,1°	(motor. Unruhe)
50	36,7°	
51	36.5°	
52	36,5°	(allgemeines Muskelzittern beginnt)
54	36,0°	
56	35,5°	
6h 00′	34,0°	
01	32,5°	
02	30,5°	
05	28,0°	(heftige Abwehrbewegungen!)
06	29,0°	
07	28,0°	
08	28,0°	(heftige Abwehrbewegungen!)
09	29,0°	
11	27,0°	

Das Tier, aus dem Bade genommen und losgebunden, bleibt mit ausgestreckten Extremitäten liegen.

6h 18′	26,0°
8h 24′	24,0°

Am nächsten Morgen tot aufgefunden.

c) Kaninchen von 2,2 kg. Ein Bad im Wasser von 8 bis 9° bewirkt ungewöhnlich schnell Abkühlung auf 29°. Das Tier erholte sich vollkommen. Einige Tage später Wiederholung des Versuchs. Diesmal erfolgt das Absinken der Temperatur viel langsamer, derart, daß ein Bad von 28 Min. Dauer (Wassertemperatur 8 bis 9°) erforderlich war, um die Temperatur auf 30° herabzudrücken. Das Tier wurde am nächsten Morgen tot aufgefunden.

d) Kaninchen von 2 kg. Durch ein halbstündiges Bad von 8 bis 9° wird die Temperatur auf 19,5° herabgedrückt. Nach Beendigung des Bades liegt das Tier kältestarr auf der Seite. In einem Bade von 40° erfolgt bald Erholung, während die Temperatur auf 29,5° ansteigt. Das Tier geht aber dennoch, jedoch erst nach 2 Tagen zugrunde.

Es ist nun tatsächlich nicht schwer, derartige Mißerfolge zu vermeiden.

Versuch 1.

Kleines Kaninchen, 1500 g. Grünfutter.

Datum	Abkühlungsprozedur	Harnmenge im Tage ccm	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter Harn	
2. XII.	Bad im Wasser von 6° von $^1/_4$-stünd. Dauer. Temp. auf 15° abgesunken. Tier ist ganz starr; die Hinterbeine sind krampfhaft gestreckt. Das Tier wird sofort in ein warmes Bad von 40° gebracht. Temp. ist nach $^1/_4$ Std. auf 28,5°, nach einer weiteren $^1/_4$ Std. auf 34° gestiegen. Am nächsten Morgen: 37,4°; erst am nächsten Tage wird normale Anfangstemperatur (38,9°) wieder erreicht				
3.					
4.	Bad in Wasser von 12 bis 13° von 12 Min. Dauer. Temp. sinkt von 38,9° auf 29,3° ab	86	0,088	1,023	
5.		170	0,062	0,365	
6.		134	0,054	0,477	
7.		260	?	?	
8.		430	?	?	
9.	Abends: Bad in Wasser von 9,5° von 15 Min. Dauer. Temp. sinkt auf 22,2° ab	414	0,028	0,070	
10.		74	0,135	1,811	Eiweiß 0 Zucker 0
11.	Abends: Bad in Wasser von 9 bis 13° von 15 Min. Dauer. Temp. sinkt von 38,4° auf 30,5° ab				
12.		274	0,015	0,055	
13.		314	?	?	
14.		270	?	?	
15.		150	?	?	
16.	Abends: Bad in Wasser von 8° von 15 Min. Dauer. Temp. sinkt von 38° auf 28° ab	106	0,036	0,339	
17.		240	0,069	0,276	
18.		240	0,056	0,224	

Vor allem wird man während des Bades durch ein im Rectum des Tieres ständig festgehaltenes Thermometer die Körpertemperatur des Tieres genau überwachen und dasselbe aus dem Bade entfernen, sobald die Temperatur auf 30° abgesunken ist[1]). Man darf aber nunmehr das Tier nicht sich

[1]) Man bemerkt bei derartigen Versuchen, daß der Temperaturabfall vielfach nicht stetig, vielmehr stoßweise erfolgt. Heftige Anstrengungen des gefesselten Tieres, sich aus seiner Lage zu befreien, können eine vorübergehende Erhöhung der Körpertemperatur bewirken.

selbst überlassen, muß vielmehr die Temperatur auch weiterhin kontrollieren. Ergibt etwa eine Messung nach $^1/_2$ Stunde, daß die Temperatur weiter abgesunken ist, so ist Gefahr im Verzuge und es handelt sich nun darum, den Mechanismus der Wärmeregulation, deren Beherrschung dem Tiere abhanden gekommen ist, wieder in Gang zu bringen. Es geschieht dies am einfachsten durch Übertragung des Tieres in ein warmes Bad von 37 bis 40°. Ist darin, was nach kurzer Zeit zu geschehen pflegt, die Körpertemperatur des Tieres auf wenig über 30° gestiegen, so ist ein neuerliches Absinken derselben nur mehr ausnahmsweise zu befürchten. Es ist mir so gelungen, Tiere auch nach Unterkühlung auf sehr niedere Temperaturen am Leben zu erhalten.

Ich gehe nunmehr zur Beschreibung meiner eigentlichen Versuche über.

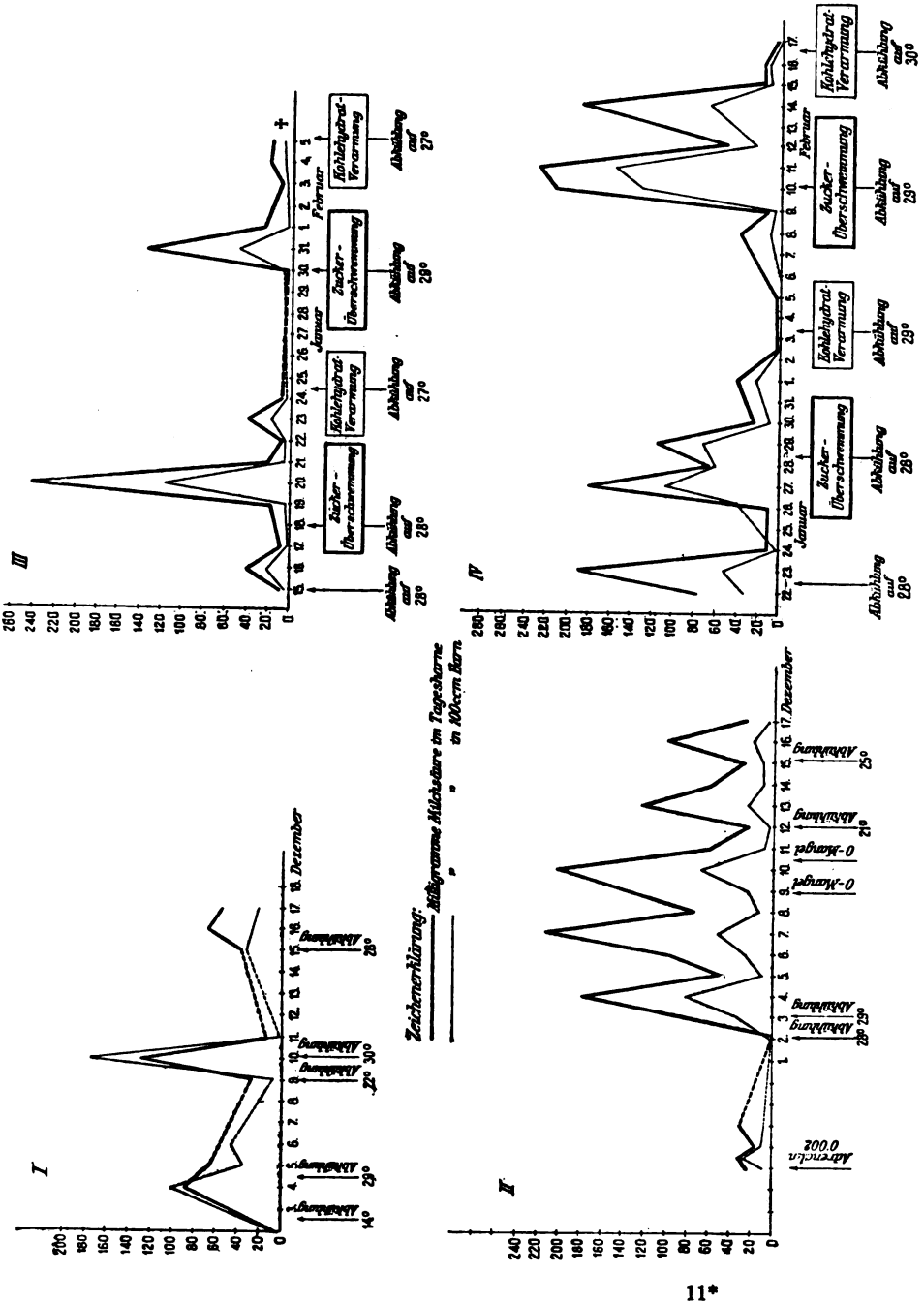
Der Versuch (Fig. I) lehrt, daß eine Wiederholung des Abkühlungsreizes nur dann zu einer erneuten Milchsäureausschüttung geführt hatte, wenn dem Tiere ein Erholungsintervall gegönnt worden war. Dort, wo die Abkühlungreize in allzu schnellem Tempo (mit dem Intervalle von nur einem Tage) aufeinander gefolgt waren, um eine Restitutio ad integrum zu gestatten, war eine Milchsäureausschüttung nach der späteren Abkühlung ausgeblieben.

Bei dem darauffolgenden Versuche wurde zunächst festgestellt, daß die Auslösung einer Adrenalinglucosurie keineswegs zu einer Milchsäureausschüttung führt, daß also eine solche nicht etwa die natürliche und unmittelbare Begleiterscheinung einer durch Massenausschüttung der Glykogenvorräte aus der Leber hervorgerufenen Hyperklykämie ist. Die Beobachtung Neubauers[1]), der zufolge die Piqûre zur Milchsäureausscheidung führen kann, legte einen derartigen Gedankengang immerhin nahe[2]).

Häufig (zumal in den späteren Phasen des Versuchs) haben sie aber den gegenteiligen Effekt und bewirken ein stoßweises Absinken der Temperatur um 1 bis 2°.

[1]) E. Neubauer, diese Zeitschr. **43**, 365, 1912.

[2]) Ich habe mich übrigens davon überzeugt, daß Lactacidurie nicht notwendigerweise eine Folge der Piqûre sein muß. Zum mindensten schied eine Katze, bei der der Boden des vierten Ventrikels nach operativer Freilegung in der Mittellinie in der Gegend des Vaguszentrums perforiert worden war, nach eintägiger Anurie 70 ccm eines Harnes ab, der 2,48 g Zucker, aber nur minimale Mengen (0,007 g) Milchsäure enthielt.


Zeichenerklärung:
Milligramme Milchsäure im Tagesharne
" " in 100 ccm Harn
I
II
III
IV
Dezember
Januar
Februar
Abkühlung auf 28°
Abkühlung auf 25°
Abkühlung auf 21°
Abkühlung auf 14°
0-Hunger
Zucker-Überschwemmung
Kohlehydrat-Verarmung

Versuch 2.

Kaninchen, 3200 g. Grünfutter.

Datum	Abkühlungsprozeduren	Weitere Eingriffe	Menge des Tagesharnes ccm	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Zucker im Tagesharn
23. XI.			386	?	?	—
24.			560	?	?	
25.		Inj. von 0,002 Adrenalin hydrochlor.	340	0,020	0,060	0
			118	0,030	0,254	4,67
26.			192	0,016	0,083	1,06
27.			446	0,030	0,070	0
28. bis 1. XII.			?	?	?	
2.	Das kurzgeschorene benetzte Tier wird ½ Std. lang einem lebhaften Luftstrome (Ventilator) ausgesetzt, wodurch seine Temp. von 38,2 auf 28° absinkt		122	0	0	0
3.	do. Temp. sinkt von 38,2 auf 29,5° ab		242	0,075	0,310	0
4.			220	0,180	0,819	0
5.	Tier wird im Freien bei ca. 4° gehalten, doch bleibt seine Temp. konstant auf 38,2°		602	0,048	0,090	0
6.	Das kurzgeschorene Tier wird dauernd bei 0 bis 2° Lufttemp. im Freien gehalten. Körpertemp. 36,4° bis 35,2°. Erhöhte Freßlust!		460	0,118	0,235	0
7.			412	0,216	0,525	0
8.			594	0,072	0,120	0
9.		Erstickungsversuch: Das Tier wird um 10 Uhr 20 Min. unter eine große aufgeschliffene Glasglocke gebracht. Um 11 Uhr bereits merkliche Dyspnoe, die sich allmählich steigert, um 12 Uhr 45 Min. schwere Dyspnoe. Tier atmet mit zurückgeworfenem Kopfe. Es wird jetzt aus der Glocke genommen, worauf es sich erholt. Dann wird es um 1 Uhr wieder unter die Glocke gebracht. Um 3 Uhr schwere Dyspnoe. Tier schwankt. Versuch wird unterbrochen. Körpertemperatur 35,1°	520	0,140	0,270	
			454	0,207	0,456	0

Versuch 2 (Fortsetzung).

Datum	Abkühlungsprozeduren	Weitere Eingriffe	Menge des Tagesharnes ccm	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Zucker im Tagesharn
10.		Erstickungsversuch: 8 Uhr 30 Min. Tier wird unter die Glocke gebracht und diese mit Hilfe einer Wasserstrahlluftpumpe langsam evakuiert. Um 4 Uhr 30 Min. bereits schwere Dyspnoe, Kopf zurückgeworfen. Tier auf Vorderbeinen hochaufgerichtet. Der ganze Körper wird bei den Atemzügen stoßweise bewegt. 4 Uhr 50 Min.: Tier fällt auf die Seite. Es wird nun sogleich Luft in die Glocke eingelassen.				
11.			400	0,061	0,150	0
12.	Bad in Wasser von 9 bis 12° von 20 Min. Dauer. Nach Beendigung derselben ist die Temp. auf 21 bis 22° abgesunken. Tier liegt unter leichten Zuckungen auf der Seite. Es wird sogleich in ein Bad von 40° gebracht, worauf die Temp. auf 28° ansteigt und das Tier sich erholt. Am nächsten Tag ist Temp. 39,5°		400	0,023	0,056	
13.			500	0,125	0,250	0
14.			526	0,050	0,090	0
15.	Bad in Wasser von 8° von 15 Min. Dauer. Temp. sinkt von 39° auf 28°		274	0,031	0,115	0
16.			488	0,098	0,200	0
17.			470	0,026	0,053	0

Es wurde sodann durch kurzdauernde Abkühlung eine Milchsäureausschüttung hervorgerufen. Eine zweite Milchsäureausschüttung wurde durch eine protrahierte, wenn auch nur sehr mäßige Abkühlung erzielt (indem das geschorene Tier bei einer Temperatur von 0 bis 4° dauernd im Freien gehalten wurde). Eine dritte Milchsäureausschüttung wurde durch einen Erstickungsversuch, eine vierte und fünfte wiederum durch Abkühlung provoziert.

Versuch 3.

Kaninchen, 2,2 kg. Grünfutter.

Datum	Abkühlungsprozeduren	Weitere Behandlung	Menge des Tagesharnes ccm	Milchsäure im Tagesharn	Milchsäure im Liter	Zucker im Tagesharn
15. I.	Abends: Bad von 8 bis 9° u. 20 Min. Dauer. Temp. sinkt von 39,5° auf 30,0° ab.	Grünfutter	130	0,009	0,073	0
16.		Grünfutter	210	0,042	0,210	0
17.		30 g Dextrose in 100 ccm Wasser per Schlundsonde und Grünfutter	115	0,009	0,081	0
18.		do.	285	?	?	
19.	Abends: Bad von 8 bis 9° u. 19 Min. Dauer. Temp. sinkt von 38,5° auf 30,0° ab. Das Tier bleibt zunächst auf der Seite liegen, erholt sich aber bald.	do.				
20.		do.	260	0,262	1,010	0
21.		do.				
		Hunger, Adren. 0,001	230	0,020	0,088	0
22.		„ „ 0,002	100	0,009	0,085	vorh.
23.		„ „ 0,002	240	0,042	0,210	1,49
24.	Abends: Bad von 8° und 19 Min. Dauer. Temp. sinkt von 38,8° auf 30,0° ab. 1/4 Std. nach Beendigung des Bades ist die Temp. weiter auf 27° abgesunken. Durch ein 1/4 std. Bad von 38° wird sie wied. auf 32,5° gehoben.	„	110	0,005	0,046	0,33
25.		Hunger	100	0,006	0,060	0
26.		Grünfutter	60	0,006	0,100	0
27.		„				
28.		„	220	?	?	
29.		30 g Dextrose in 100 ccm Wasser per Schlundsonde und Grünfutter.	120	?	?	
30.	Abends: Bad von 7° und 15 Min. Dauer. Temp. sinkt von 38,2° auf 29,5°. Dann warmes Bad von 39° und 5 Min. Dauer, worauf Temp. auf 31,5° ansteigt.	do.	115	0,009	0,080	0
31.		do.	190	0,137	0,721	0
1. II.		do.	405	0,026	0,065	0
2.		Grünfutter	360	?	?	
3. III.		Hunger, Adren. 0,002	170	0,011	0,065	0
4.		„ „ 0,002	280	0,021	0,075	1,40
5.	Temp. ist auf 36,8° abgesunken. Abends: Kaltes Bad v. 25 Min. Dauer, setzt Temp. auf 27 bis 28° herab. Im warmen Bade steigt Temp. auf 33,4°. Trotzdem geht das Tier bei Nacht zugrunde.	„	135	?	?	0,20

Der Verlauf der Milchsäureausscheidungskurve (Fig. II) ist hier ein sehr charakteristischer und lehrreicher. Wir ersehen aus dem Kurvenbilde, daß das Tier auf eine Reihe von Eingriffen (Abkühlung oder Erstickung), die von entsprechenden Erholungsintervallen getrennt, aufeinander folgten, immer wieder mit Milchsäureausschüttung reagiert hat. Halten wir damit die beim vorigen Versuche gewonnene Erkenntnis zusammen, daß die Milchsäureausschüttung ausbleibt, wenn die Erholungspause nach einer vorausgegangenen Ausschüttung allzu kurz ausgefallen ist, so drängt sich uns der Eindruck auf, daß der Organismus nicht etwa in unbegrenzter Weise jederzeit Milchsäure zu produzieren vermag, vielmehr in einem gegebenen Momente nur über einen gewissen Vorrat an Lactacidogen verfügen dürfte, der allerdings, wenn verbraucht, unter normalen Ernährungsbedingungen ziemlich schnell regeneriert zu werden scheint.

Der vorhergehende Versuch ist nun in der Weise durchgeführt worden, daß eine Periode der Kohlenhydratverarmung (durch Kombination von Hunger mit Adrenalininjektionen hervorgerufen) zwischen zwei Perioden der Zuckerüberschwemmung eingeschoben, und in jeder Periode, sowie in einer normalen Vorperiode, der Effekt einer Abkühlung in bezug auf die Milchsäureausscheidung festgestellt wurde.

Fassen wir nunmehr die Resultate dieses Versuchs ins Auge, so ergibt sich dabei folgendes:

Während das normal mit Grünfutter ernährte Tier in diesem Falle auf den Abkühlungsreiz nur andeutungsweise und in der Periode der Kohlenhydratverarmung überhaupt nicht reagiert hatte, hatte derselbe Abkühlungsreiz in den beiden Perioden der Zuckerüberschwemmung eine ausgiebige Milchsäureausschüttung zur Folge.

Von denselben Gesichtspunkten aus wie dieser Versuch wurde auch der nächstfolgende durchgeführt.

Es ist hier gelungen, den Abkühlungsreiz in fünf aufeinanderfolgenden Versuchsperioden wirken zu lassen; zuerst am

Versuch 4.

Kaninchen, 2,6 kg. Grünfutter.

Datum	Abkühlungsprozeduren	Weitere Behandlung	Menge des Tagesharnes ccm	Milchsäure im Tages-harn	Milchsäure im Liter	Zucker im Tages-harn
22. I.	Bad von 8° u. 1/2 Std. Dauer. Temp. sinkt von 39,2° auf 30,3° ab. 1/4 Std. nach Unterbrechung des Bades ist die Körpertemp. noch weiter auf 28° abgesunken. Daher warmes Bad von 37° und 1/4 Std. Dauer.	Grünfutter	285	0,077	0,305	
23.		Grünfutter	350	0,187	0,537	0
24.		do.	275	0,010	0,035	
25.		do.	325	?	?	
26.		30 g Dextrose in 100 ccm Wasser per Schlund-sonde, Grünfutter.	125	?	?	
27.			165	0,182	1,103	
28.	Bad von 8° u. 1/2 Std. Dauer. Temp. sinkt von 38,5° auf 31,0° ab. 20 Min. nach Unterbrechung des Bades ist Temp. weiter auf 28° abgesunken. Daher warmes Bad von 1/4 Std. Dauer, worauf T. auf 34° aufsteigt.	do.	90	0,060	0,666	
29.		do.	160	0,114	0,713	
30.		Grünfutter	185	0,022	0,118	
31.		Adrenalin 0,002	265	?	?	
1. II.		Hunger, Adren. 0,002	180	0,040	0,222	3,42
2.		"	80	0	0	0,56
3.	Temp. vor dem Bade 37,1°. Wird durch ein halbstünd. kaltes Bad auf 29,8° heruntergedrückt. Nachher durch ein warmes Bad wieder auf 33° erhöht.	"				
4.		Hunger	55	0,002	0,037	0
5.		Grünfutter	70	0	0	0
6.		"	60	?	?	
7.		"	290	?	?	
8.		"	430	0,038	0,090	0
9.		30 g Dextrose in 100 ccm Wasser per Schlund-sonde, Grünfutter.	170	0,012	0,070	0
10.	Abends: Bad von 8° und 20 Min. Dauer. Temp. sinkt von 38,6° auf 29,2° ab. 1/4 Std. nach Beendigung des Bades: 30,2°.	do.	160	0,213	1,331	
11.		do.	145	0,225	1,552	0

Versuch 4 (Fortsetzung).

Datum	Abkühlungsprozeduren	Weitere Behandlung	Menge des Tagesharnes ccm	Milchsäure im Tages-harn	Milchsäure im Liter	Zucker im Tages-harn
12. II.		Grünfutter	215	0,049	0,228	0
13.		„	290	?	?	
14.		Grünfutt., Adren. 0,002	270	0,186	0,690	0
15.		Hunger, Adren. 0,002	63	0,016	0,248	0,95
16.	Nachmittags: Temp. 37,5°. Kaltes Bad von 7° und 25 Min. Dauer. Temp. sinkt von 37,5° auf 30,0° ab. Tier hochgradig apathisch. Temp. 1/4 Std. nach Beendigung des Bades 31,3°.	„				0,06
17.		Hunger	0	0	0	0
18.		Grünfutter	140	0,002	0,014	0
19.		„	100	0,007	0,065	0

Versuch abgebrochen.

normal ernährten Tiere, dann 2 mal im Zustande der Zuckerüberschwemmung und 2 mal im Zustande der künstlichen, durch die Kombination von Hunger und Adrenalininjektionen herbeigeführten Kohlenhydratverarmung, und zwar wurde der Versuch derart angeordnet, daß die Perioden der Zuckerüberschwemmung und der Kohlenhydratverarmung miteinander abwechselten. Das Resultat dieses Versuches ist ein durchaus eindeutiges: Es hat bei unserem Versuchstiere im Zustande der Zuckerüberschwemmung gar nicht erst des Abkühlungsreizes bedurft, um die Milchsäureausschüttung auszulösen. Dieselbe ist vielmehr in diesem Falle (was ich bei früheren Versuchen niemals zu beobachten Gelegenheit hatte) bereits durch die Zuckeranreicherung des Organismus als solche ausgelöst worden. Trotzdem es sich also offenbar um ein zur Milchsäureausscheidung prädisponiertes Individuum gehandelt hat (was auch aus der Reaktion des normalen Tieres zu Beginn des Versuches dem Kältereize gegenüber hervorgeht), gelang es im Zustande der Kohlenhydratverarmung in keiner Weise, durch Abkühlung auch nur die Andeutung einer Milchsäureausschüttung zu erzielen.

Daß zwischen der Glucosurie als solcher und der Lactacidurie kein unmittelbarer und direkter Zusammenhang besteht, geht auch aus diesen Versuchen (ebenso wie aus den in der ersten Arbeit mitgeteilten) zur Genüge hervor.

Ich beabsichtige nun zunächst, in ähnlicher Weise, wie es hier in bezug auf den Traubenzucker geschehen ist, auch den Einfluß anderer Zuckerarten, des Glycerinaldehyds, der Brenztraubensäure sowie des Methylglyoxals auf die durch den Kältereiz ausgelöste Milchsäureausscheidung näher zu studieren.

Zusammenfassung.

1. Kaninchen, deren Körpertemperatur durch Abkühlung in einem kalten Bade vorübergehend auf 30,0° oder darunter herabgesetzt worden war, pflegen auf diesen Eingriff, wie dies bereits von Araki festgestellt worden ist, mit einer Steigerung der Milchsäureausscheidung zu reagieren.

2. Ein gut genährtes Kaninchen vermag auf eine Reihe aufeinanderfolgender Abkühlungsreize, vorausgesetzt, daß dieselben durch entsprechende Erholungsintervalle voneinander getrennt sind, immer wieder mit Milchsäureausschüttung zu reagieren. Eine solche bleibt aber aus, wenn die Erholungspause nach einer vorausgegangenen Ausschüttung allzu kurz bemessen worden ist.

3. Dieses Verhalten erweckt den Eindruck, als ob der Organismus nicht etwa in jedem Augenblicke in unbegrenzter Weise Milchsäure zu produzieren vermöchte, vielmehr in einem gegebenen Momente nur über einen gewissen Vorrat von „Lactacidogen“ (Embden) verfügen würde, der allerdings unter normalen Ernährungsbedingungen anscheinend ziemlich schnell regeneriert werden kann.

4. Läßt man die Abkühlungsreize bei einem und demselben Tiere abwechselnd einerseits im Zustande künstlicher Überschwemmung mit Traubenzucker, andererseits aber im Zustande hochgradiger Kohlenhydratverarmung (wie er durch die Kombination von Hunger mit Adrenalininjektionen hervorgerufen wird) einwirken, so erweist sich das Tier im ersteren Falle zur Milchsäureausschüttung hochgradig disponiert,

während im letzteren Falle jede Andeutung einer Milchsäureausschüttung ausbleibt.

5. In einem der Versuche hat bereits die Zuckerüberschwemmung als solche auch bei Abwesenheit des Abkühlungsreizes ausgereicht, um eine Milchsäureausschüttung zu provozieren.

6. Durch diese Versuchsreihe erscheint die Abhängigkeit der Milchsäureausscheidung vom Kohlenhydratbestande des Organismus ausreichend sichergestellt.

Über den Karnosingehalt der Säugetiermuskeln.

Von

Otto von Fürth und Theodor Hryntschak.

(Eingegangen am 7. Mai 1914.)

I.

Einleitung.

Bekanntlich ist das Karnosin, das als einer der Hauptbestandteile des Muskels gelten darf, bis vor nicht langer Zeit gänzlich übersehen worden. Wir verdanken seine Entdeckung dem russischen Forscher Gulewitsch, der gemeinsam mit seinen Mitarbeitern die Zusammensetzung und die wichtigsten Eigenschaften desselben sichergestellt hat. Die Isolierung der (mit dem von Kutscher aus Fleischextrakt gewonnenen Ignotin allem Anschein nach identischen) Base von der Zusammensetzung $C_9H_{14}N_4O_3$, die als ein aus Histidin und β-Alanin zusammengesetztes Dipeptid gedeutet wird, beruht auf dem Umstande, daß sie nicht mit Silbernitrat direkt, wohl aber bei weiterem Zusatze von Barytwasser fällbar ist. Nach Zerlegung des Silberniederschlages mit Schwefelwasserstoff krystallisiert aus der mit Salpetersäure neutralisierten Flüssigkeit das leichtlösliche Karnosinnitrat in Gestalt strahliger Nadeln aus.[1])

Der eine von uns hat sich nun seinerzeit gemeinsam mit C. Schwarz[2]) bemüht, eine Vorstellung betreffend den Karnosingehalt der Säugetiermuskulatur zu gewinnen. Durch Ermittelung der Stickstoffverteilung in Muskelextrakten wurde festgestellt, daß in der Skelettmuskulatur des Pferdes etwa

[1]) Vgl. die Literatur: O. v. Fürth, Probleme der physiol. und pathol. Chem. I, 149 bis 151 (1912) und M. Mauthner über den Karnosingehalt der Säugetiermuskeln (ausgeführt unter Leitung von O. v. Fürth). Monatshefte f. Chem. **34**, 6. Heft, S. 883, Juni 1913.

[2]) O. v. Fürth und C. Schwarz, Über die Verteilung des Extraktivstickstoffes im Säugetiermuskel. Diese Zeitschr. **30**, 413, 1911.

ein Drittel des Extraktivstickstoffes auf das Kreatin und Kreatinin, und ein weiteres Drittel auf die „Karnosinfraktion" entfällt, während alle anderen Bestandteile zusammengenommen nur das letzte Drittel ausmachen. Die Ermittelung der „Karnosinfraktion" erfolgte dabei in der Art, daß, nach Beseitigung aller durch neutrales Bleiacetat und Silbernitrat fällbarer Substanzen, im Filtrate durch die Kombination von Silbernitrat mit einem Überschusse von Barytwasser eine Fällung erzeugt und der Stickstoffgehalt derselben nach Kjeldahl bestimmt wurde. Ähnliche Befunde wurden späterhin auch von anderen Autoren erhoben: So fanden in 100 g feuchter Muskulatur[1]):

Fürth und Schwarz:

Skelettmuskulatur des Pferdes	0,105 bis 0,117 g N	der Karnosinfraktion
Herzmuskulatur des Pferdes	0,086 „ 0,109 „ „	„ „

Skworzow:[2])

Rindfleisch	0,120 g N	der Karnosinfraktion
Kalbfleisch	0,065 bis 0,069 „ „	„ „

Buglia und Constantino:[3])

Skelettmuskulatur von Säugetieren	0,105 g N	der Karnosinfraktion
Herzmuskulatur	0,045 „ „	„ „
Glatte Muskulatur des Retractor penis	0,036 „ „	„ „

v. Winiwarter:[4])

Uterusmuskulatur des Menschen	0,045 g N	der Karnosinfraktion
Uterusmuskulatur des Pferdes	0,026 „ „	„ „

[1]) Für den Gesamt-Extraktivstickstoff des Rindfleisches fanden Offer und Rosenquist 0,42%, Adler 0,46%. In 100 g feuchter Extremitätenmuskulatur des Pferdes und Hundes fanden Fürth und Schwarz (l. c.) nach Abrechnung der sekundären Spaltungsvorgängen entstammenden Albumosen 0,327 bis 0,382 g Extraktiv-N, in der Herzmuskulatur 0,294 g Extraktiv-N.

[2]) W. Skworzow (Med. chem. Inst. Moskau), Zur Kenntnis der Extraktivstoffe des Muskels XI. Eine vergleichende Untersuchung der N-haltigen Extraktivstoffe des Kalb- und Rindfleisches. Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 33, 1910. Die hier in Betracht kommenden Werte finden sich in der Arbeit S. 33 unter der Kolonne I. Silberbarytniederschlag rubriziert.

[3]) G. Buglia und A. Constantino (Physiol. Inst. Neapel), Der Stickstoff einiger Extraktivstoffe und der Purinbasen in der glatten, der quergestreiften und der Herzmuskulatur der Säugetiere. Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 120, 1912.

[4]) A. F. v. Winiwarter (ausgeführt unter Leitung von O. v. Fürth), Die Verteilung der Extraktivstoffe in der glatten Muskulatur des Uterus. Arch. f. Gynäkol. 100, Heft 3, 1913.

Nunmehr ergab sich aber die wesentliche Frage, ob der Stickstoff der „Karnosinfraktion" wirklich vorwiegend auf Karnosin als solches oder aber auch auf andere Extraktivstoffe unbekannter Art, die mit ihm gemeinsam bei der Prozedur der Silberbarytfällung niedergeschlagen werden, bezogen werden müsse.

Von diesem Gesichtspunkte aus hat auf Veranlassung des einen von uns Marie Mauthner[1]) kürzlich Bestimmungen des nach Spaltung des Karnosins auftretenden Histidins, sowie Versuche über die Gewinnung, analytische Zusammensetzung und quantitative Bestimmung einer aus der „Karnosinfraktion" darstellbaren Pikrolonsäureverbindung des Karnosins ausgeführt. Die quantitative Bestimmung des nach Säurehydrolyse aus Karnosinfraktionen abspaltbaren Histidins nach dem Kosselschen Pikrolonsäureverfahren ergab, daß in der Tat die Hauptmenge des in den „Karnosinfraktionen" enthaltenen Stickstoffes in Form von Karnosin oder einer demselben nahestehenden Verbindung vorhanden zu sein schien. Zu demselben Ergebnisse führte auch die Abscheidung einer Base aus den Karnosinfraktionen in Form eines schwerlöslichen, in gelben Nadelaggregaten krystallisierenden Pikrolonates, das (auf Grund der Elementaranalyse, sowie der quantitativen Bestimmung der daraus nach HCl-Spaltung abtrennbaren Pikrolonsäure) sich mit der Mononatriumverbindung eines Karnosindipikrolonates annähernd übereinstimmend erwies.

Für eindeutig konnten jedoch diese Befunde nicht gelten; schon darum nicht, weil, wenn sich etwa dem Karnosin in den Fraktionen eine demselben nahestehende Base beimengen sollte, es angesichts des hohen Molekulargewichtes der Pikrolonsäure und der Ähnlichkeit der Lösungsverhältnisse der Pikrolonate schwer möglich, wenn nicht ganz unmöglich sein dürfte, derartige Gemenge mit Sicherheit zu trennen.

Würde der Stickstoffgehalt der „Karnosinfraktionen" wirklich ausschließlich auf Karnosin als solches zu beziehen sein. so müßte z. B. in 1 kg Skelettmuskulatur des Pferdes die imposante Menge von mehr als 4 g Karnosin enthalten sein. Tatsächlich ist es aber bisher keinem Untersucher gelungen,

[1]) l. c.

auch nur annähernd eine derartige Karnosinausbeute zu erzielen.

So hat Krimberg[1]) unter genauer Einhaltung des Vorganges von Gulewitsch aus 1 kg frischen Ochsenfleisches nur 1,3 g Karnosin in Form des salpetersauren Salzes gewonnen, allerdings ohne geradezu einen quantitativen Vorgang angestrebt zu haben.

Japanische Autoren[2]) haben bei Verarbeitung frischen Fischfleisches bestenfalls eine Ausbeute von 2,0 g Karnosin, meist aber erheblich weniger erzielt.

Skworzow[3]) isolierte aus Ochsenfleisch, allerdings ohne quantitative Bestimmungen zu bezwecken, eine 1,3 g Karnosin pro Kilogramm entsprechende Menge der Base in Form des salpetersauren Salzes.

Yoshimura[4]) gelang es auffallender Weise nicht, aus dem Fleische des Wildkaninchens durch Silberbarytfällung Karnosin zu isolieren. Dagegen konnte aus dem Filtrate nach Beseitigung des Silbers und des Baryums eine Base durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, die nach Zerlegen des Niederschlages als Platinat und Nitrat isoliert und analysiert, als Karnosin erkannt wurde. Dieses fand sich in einer Ausbeute von 2,23 g pro Kilogramm.

Schließlich hat kürzlich Smorodinzew[5]), der unter der sachkundigen Leitung von Gulewitsch die Basen aus einem relativ großen Quantum Pferdefleisch (18 kg) zu gewinnen bemüht war, keine größere Ausbeute als 1,82 g Karnosin pro Kilogramm Fleisch zu erzielen vermocht. Bei Verarbeitung von Schweinefleisch betrug die Ausbeute 1,92 g Karnosin pro Kilogramm.

Wenngleich es nach den mustergültigen Untersuchungen von Gulewitsch keinem Zweifel unterliegt, daß sich das Karnosinnitrat bei Verarbeitung größerer Quantitäten von Muskelfleisch oder Fleischextrakt sehr wohl zur präparativen

---

[1]) R. Krimberg (Med. chem. Labor. Moskau), Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln IV. Über das Vorkommen des Karnosins, Karnitins und Methylguanidins im Fleisch. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 204, 1907.

[2]) U. Susuki, K. Yoshimura, M. Jamakawa und Y. Irie, Über die Extraktivstoffe des Fischfleisches. Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 1, 1909.

[3]) Skworzow, l. c. S. 36.

[4]) K. Yoshimura (Univ. Labor. f. Nahrungsmittelchemie Halle a. S.), Über das Vorkommen einiger organischer Basen im Fleisch des Wildkaninchens. Diese Zeitschr. 87, 477, 1911.

[5]) J. Smorodinzew (Med. chem. Inst. Moskau), Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln XV. Über das Vorkommen des Karnosins, Methylguanidins und Karnitins im Pferdefleisch. Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 12, 1913.

Reindarstellung des Karnosins verwerten läßt, erscheint dieses Salz schon seiner Leichtlöslichkeit wegen für eine exakte Ermittelung des Karnosingehaltes von Fleischproben wenig geeignet und dies um so weniger, als man bei Gegenwart gewisser Beimengungen keineswegs auf ein quantitatives Auskrystallisieren der Base rechnen darf. „Inzwischen hat es sich", sagt Gulewitsch in einer neuen einschlägigen Abhandlung[1]), „bei den von mir und meinen Mitarbeitern ausgeführten Untersuchungen erwiesen, daß bei der Gewinnung von Karnosin, resp. Karnosinnitrat eine Substanz durch Silbernitrat und Barythydrat mitgefällt wird, die sich dann bei der fraktionierten Fällung der wässerigen Lösungen von Karnosin, resp. Karnosinnitrat durch Alkohol sirupartig ausscheidet und das Auskrystallisieren der Karnosinpräparate unter Umständen sehr erschweren kann, während reine Karnosin- resp. Karnosinnitratlösungen beim vorsichtigen Vermischen mit Alkohol ausgezeichnet und sehr leicht auskrystallisieren."

Die zweifellos große physiologische Bedeutung des Karnosins ließ es daher geboten erscheinen, nach anderen Mitteln und Wegen Ausschau zu halten, um über den wahren Karnosingehalt der Muskeln einigermaßen sichere Aufschlüsse zu erhalten. Schließlich erwiesen sich uns, wie wir vorausschickend bemerken wollen, zwei Wege als gangbar: Einerseits die colorimetrische Bestimmung der tiefblau gefärbten Kupferverbindung des Karnosins, andererseits die colorimetrische Auswertung der schönen Farbenreaktion, die das Karnosin vermöge der in seinem Moleküle enthaltenen Histidinkomponente mit Diazobenzolsulfosäure gibt.

Gulewitsch hat seinerzeit darauf hingewiesen, daß die von ihm beschriebene schwerlösliche Kupferverbindung des Karnosins, die sich in tiefblau gefärbten, sechseckigen regelmäßig ausgebildeten oder verlängerten, an blaugefärbte Cystinkrystalle erinnernden Täfelchen auszuscheiden pflegt, zur Identifizierung des Karnosins die besten Dienste zu leisten vermöge. Es lag daher nicht allzuferne, die günstigen Eigenschaften dieser

[1]) M. Gulewitsch (Med. chem. Labor. Moskau), Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln XIV. Über das Karnosin und Karnosinnitrat. Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 1, 1913.

Verbindung einem colorimetrischen Bestimmungsverfahren zugrunde zu legen.

Der andere Weg der Karnosinbestimmung ist durch den Umstand gangbar geworden, daß, wie kürzlich M. Weisz und N. Ssoboleff[1]) in diesem Laboratorium gefunden haben, die von Pauly zum Nachweise des Histidins angegebene Farbenreaktion mit Diazobenzolsulfosäure unter Einhaltung bestimmter Versuchsbedingnugen für die colorimetrische Bestimmung des letzteren verwertet werden kann. Dabei wird durch serienweise angestellte Verdünnungsversuche jener Verdünnungsgrad der zu prüfenden Lösung ermittelt, bei dem die Probe und eine entsprechend behandelte Standard-Lösung von salzsaurem Histidin (1 : 10000) dieselbe Färbungsintensität aufweisen. Es hat sich nun herausgestellt, daß auch das in Moleküle des Karnosins an Alanin gebundene Histidin sich in colorimetrischer Hinsicht diesem letzteren durchaus analog verhält.

Wir gehen nunmehr zur Mitteilung unserer Versuche über.

II.

Colorimetrische Vorversuche.

Diazocolorimetrie.

Um uns über die Anwendbarkeit des colorimetrischen Verfahrens, das auf der Farbenreaktion der Histidinkomponente des Karnosins mit der Diazobenzolsulfosäure beruht, zu vergewissern, gingen wir zunächst daran, uns ein die Garantien ausreichender Reinheit gewährendes Karnosinpräparat zu bereiten.

Zu diesem Zwecke wurde aus einer größeren Menge ganz frischen Pferdefleisches nach dem Vorgange von Gulewitsch die „Karnosinfraktion“ durch Fällung mit Silber und Baryt in bekannter Weise bereitet und das Karnosin in die Kupferverbindung übergeführt. Das Präparat (mehrere Gramm der Rohkrystallisation von Karnosinkupfer) wurde sodann in Ammoniak gelöst und die Lösung eingedunstet, wobei sich in einer schmutzig grün gefärbten Mutterlauge schönviolette Krystalle

[1]) M. Weisz und N. Ssoboleff, Über ein colorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Histidins. Ausgeführt unter Leitung von O. v. Fürth im Physiol. Inst. der Wiener Universität. Diese Zeitschr. 58, 119, 1913.

von der typischen Form abschieden. Die Krystalle wurden auf einem Saugfilter gesammelt, mit Wasser gewaschen, neuerlich aus ammoniakalischem Wasser umkrystallisiert, mit Wasser, absolutem Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Abgewogene Quanten der Krystalle wurden in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, der letztere durch Kochen vertrieben, die kolloides Schwefelkupfer enthaltende Lösung durch Zusatz eines Tropfens Salpetersäure geklärt, filtriert, sorgfältig nachgewaschen, das Filtrat sodann auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt.

a) Lösung, enthaltend Karnosin 0,1%, wurde in bezug auf die Diazoreaktion mit einer Lösung von reinstem Histidinchlorhydrat 0,1% nach dem Vorgange von Weiß und Ssobolew[1]) verglichen. Als Reagens diente dabei ein frisch bereitetes Gemenge von salzsaurer Sulfanilsäurelösung mit Natriumnitrit [1 : 2[2])]. $1^1/_2$ ccm desselben wurden mit 10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit gemischt und mit 3 ccm Na_2CO_3 10% versetzt. Beide Proben zeigten eine schöne Rotfärbung von annähernd gleicher Intensität; die Karnosinprobe vielleicht eine Spur schwächer. [Molekulargewicht des Karnosins $C_9H_{14}N_4O_3 = 226$, des Histidin-Monochlorhydrats $C_6H_9N_3O_2 . HCl + H_2O = 209$].

b) In 0,195 g Karnosinkupfer wurde gefunden 0,173 g Karnosin [statt berechnet: 0,145 Karnosin].

c) In 0,6378 g Karnosinkupfer wurde gefunden 0,430 g Karnosin [statt berechnet 0,473].

Zur Aufstellung der Serienversuche dienten ausgesuchte Eprouvetten von genau gleicher Weite. Die Bestimmung der Endreaktion geschah mit Hilfe eines Dubosqschen Colorimeters.

Kontrollanalysen mit abgemessenen Lösungen reiner Histidinlösungen, wobei der Gehalt der Lösung dem Untersucher unbekannt war:

Histidin:	Gefunden	0,037 g	Berechnet	0,037 g
	„	0,045 g	„	0,045 g

B. Kupfercolorimetrie.

a) Durch Zerlegung eines abgewogenen Quantums reinen Karnosinkupfers mit Schwefelwasserstoff wurde eine 0,1%ige Karnosin-Standardlösung hergestellt. 300 ccm derselben (gleich 0,300 g Karnosin) wurden mit einem Überschuß von Barytwasser versetzt; sodann wurde CO_2 eingeleitet, filtriert, zur Trockne gedampft, wieder filtriert, das in Lösung befindliche Barium mit einem geringen Überschuß von Na_2CO_3 gefällt, das Filtrat 20 Minuten lang mit Kupferhydroxyd gekocht, heiß filtriert,

[1]) l. c.

[2]) Reagens A: Sulfanilsäure 4 g, konz. HCl 40 ccm, H_2O 400 ccm (zur Lösung in der Kälte etwa 24 Stunden erforderlich). — Reagens B: $NaNO_2$ $^1/_2$%. 1 Teil von A und mit 2 Teilen B vor dem Gebrauche gemischt.

die nunmehr schön blaue Lösung auf 250 ccm aufgefüllt und mit Hilfe eines Dubosqschen Colorimeters mit einer 0,5%igen Standardlösung von Karnosinkupfer verglichen:

Gefunden 0,33 g Karnosin
Berechnet 0,30 g „

b) 0,555 g Karnosinkupfer wurde in Wasser suspendiert, mit H_2S zerlegt, die kolloide Schwefelkupferlösung durch Zusatz einiger Tropfen HNO_3 gefällt und der Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom vertrieben. Nunmehr wurde das Karnosin durch Silbernitrat und Barytwasser in üblicher Weise gefällt, der am nächsten Tage abfiltrierte Niederschlag mit HCl zerlegt, das salzsaure Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt, der abgetrennte Niederschlag mit Baryt zerlegt, der Barytüberschuß durch CO_2 beseitigt, das Filtrat zur Trockne gedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und 10 Minuten lang mit Kupfercarbonat gekocht, die heiß filtrierte blaue Lösung auf 100 ccm aufgefüllt und mit der Karnosinkupfer-Standardlösung 0,5% colorimetrisch verglichen:

Gefunden 0,529 g Karnosinkupfer
Berechnet 0,555 g „

Histidinbestimmung in hydrolysierten Muskeln.

Wir haben weiterhin einige Vorversuche in der Art ausgeführt, daß wir abgewogene Mengen Pferdefleisches der Säurehydrolyse unterwarfen, die Histidinfraktion daraus durch Silberbarytfällung abtrennten, dieselbe mit H_2S oder HCl zerlegten und in der Flüssigkeit nunmehr den Histidingehalt nach dem Diazoverfahren colorimetrisch auszuwerten versuchten.

a) 90 g frischen Pferdefleisches wurde 3mal mit Wasser ausgekocht, das Filtrat nach Beseitigung der durch Bleiacetat fällbaren Substanzen mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß der Gehalt daran 25% betrug und durch mehrstündiges Kochen hydrolysiert. Nunmehr wurde die annähernd zur Neutralisation erforderliche Menge Ätzbaryt hinzugefügt, der $BaSO_4$-Niederschlag abgenutscht und wiederholt ausgekocht, das schwach saure Filtrat mit einem Überschuß einer heißgesättigten Silbersulfatlösung (Tüpfelung gegen Barytwasser!) versetzt, sodann mit feingepulvertem Ätzbaryt gesättigt, der Niederschlag abgenutscht, mit Quarzsand und Barytwasser verrieben und neuerlich abgenutscht. Sodann wurde der Niederschlag mit Quarzsand und verdünnter Schwefelsäure verrieben, mit H_2S zerlegt und das von H_2S befreite und mit NaOH neutralisierte Filtrat auf einen Liter aufgefüllt.

In einem aliquoten Teile wurde die colorimetrische Bestimmung nach dem Diazoverfahren von Weiß und Ssobolew durchgeführt. Dieselbe ergab:

2,16 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

In der Hauptmenge der Flüssigkeit wurde die Silberbarytfällung des Histidins und der weitere Vorgang wie oben noch einmal wiederholt; es ergab sich:

1,74 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

b) Analoger Versuch mit 100 g Pferdefleisch, mit der Abweichung, daß die Silberfällung des Histidins, anstatt mit Schwefelwasserstoff, mit Salzsäure zerlegt wurde. Das Filtrat wurde (nach Beseitigung des gelösten Baryts mit Schwefelsäure) mit Natronlauge neutralisiert. Die Diazocolorimetrie ergab:

2,31 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

III.

Karnosingehalt von Säugetiermuskeln.

Unsere Vorversuche lehrten, daß man bei parallelgehender Anwendung der beiden auf grundverschiedenen Prinzipien basierenden colorimetrischen Methoden immerhin erwarten durfte, annähernd richtige Aufschlüsse über den wahren Karnosingehalt der Muskeln zu erlangen.

Versuch 1.

$^1/_2$ kg frischen Pferdefleisches wurde 3mal mit Wasser ausgekocht und das Filtrat mit Bleiacetat gefällt. Der sich teilweise kolloid abscheidende Niederschlag erwies sich erst bei Zusatz von etwas Natriumphosphatlösung (Na_2HPO_4) leicht filtrierbar. Der Zusatz dieser letzteren wurde derart gewählt, daß das Filtrat bleifrei war. Dieses wurde nunmehr mit Salzsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure vollständig ausgefällt, der Niederschlag abgetrennt, durch Verreiben mit feingepulvertem Baryt zerlegt, der Barytüberschuß mit Kohlensäure beseitigt und die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einem aliquoten Teile ergab die Diazocolorimetrie:

2,84 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

In der Hauptmenge der Flüssigkeit wurde nunmehr das Karnosin durch Silberbarytfällung niedergeschlagen und die Fällung mit H_2S zerlegt. Diazocolorimetrie:

2,78 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Versuch 2.

556 g ganz frischen Schweinefleisches. Analog wie Versuch 1. Die durch Zerlegung der Phosphorwolframsäurefällung gewonnene Flüssigkeit ergab in einem aliquoten Teile auf dem Wege der Diazocolorimetrie:

2,85 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Die Hauptmenge der Flüssigkeit wurde mit Silber und Baryt gefällt, der Niederschlag mit HCl zerlegt und die neutralisierte Flüssig-

keit in 3 Teile für die Diazocolorimetrie, Kupfercolorimetrie und für die Ermittelung des Stickstoffgehaltes geteilt.

Die Diazocolorimetrie ergab:

2,16 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Die Kupfercolorimetrie:

2,43 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Die Kjeldahlbestimmung in der „Karnosinfraktion" ergab hier einen Wert, der, auf Karnosin umgerechnet, einen Gehalt von 3,89 g Karnosin entsprechend 1 kg Fleisch berechnen ließe. Man wird angesichts der Übereinstimmung der beiden colorimetrisch ermittelten Karnosinwerte nicht daran zweifeln können, daß die „Karnosinfraktion" neben Karnosin doch noch erhebliche Mengen anderer Substanzen enthalten habe; — ein Verhalten, das in wechselndem Ausmaße, jedoch mit großer Regelmäßigkeit in fast allen unseren weiteren Versuchen sich geltend gemacht hat.

Daß die Silberbarytfällung der einfachen Phosphorwolframsäurefällung gegenüber hier ein Minus ergab, berechtigt nicht ohne weiteres zu weitergehenden Schlüssen. Denn jeder, der mit diesen Methoden praktisch gearbeitet hat, wird uns darin recht geben, daß es nicht eben leicht ist, bei den erforderlichen Manipulationen allen Anforderungen „quantitativen" Arbeitens gerecht zu werden und daß man mit der Möglichkeit von Verlusten zu rechnen hat.

Versuch 3.

540 g ganz frisches Schweinefleisch; ähnlich wie Versuch 2, mit der Abweichung jedoch, daß die Reihenfolge der Fällungen hier umgekehrt wurde, derart, daß die Silberbarytfällung der Phosphorwolframsäurefällung voranging.

Die Diazocolorimetrie ergab hier:

2,03 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch

und blieb hinter dem kupfercolorimetrischen Werte

2,89 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch

nicht unerheblich zurück. Der letztere fiel bei diesem Versuche mit dem Kjeldahlwerte der Fraktion (2,91 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch) ausnahmsweise zusammen.

Das Umgekehrte war bei dem folgenden Versuche der Fall, wo der Kjeldahlwert der Karnosinfraktion die colorimetrischen Werte um mehr als das Doppelte übertraf:

Versuch 4.

910 g ganz frisches Schweinefleisch, 3 mal mit Wasser ausgekocht, Extrakt mit Bleiacetat und Natriumphosphat gefällt. Das bleifreie Filtrat wurde geteilt:

Hälfte A: Fällung erst mit Phosphorwolframsäure, dann mit Silbernitrat und Baryt. Diazocolorimetrie:

1,99 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch

Kupfercolorimetrie:

2,31 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Der Kjeldahlwert der Fraktion ergab 5,60 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Hälfte B: Das Bleifiltrat wurde direkt mit Kupferhydroxyd gekocht, die resultierende blaue Lösung mit Sublimat gefällt, der abfiltrierte Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die von dem letzteren befreite Flüssigkeit mit Baryt alkalisch gemacht, der Barytüberschuß mit Kohlensäure beseitigt, die Flüssigkeit mit Kupferhydroxyd gekocht. Die colorimetrische Bestimmung ergab:

2,20 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Versuch 5.

950 g frisches Pferdefleisch. Erst Silberbaryt-, dann Phosphorwolframsäurefällung. Zum Schlusse wurde der Barytgehalt der Flüssigkeit durch vorsichtigen Zusatz von Na_2CO_3 beseitigt.

Diazocolorimetrie:

2,25 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch (Beobachter Hryntschak)
2,20 g „ „ 1 „ „ („ Fürth)

Kupfercolorimetrie:

1,80 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

(Kjeldahl ergab 3,84 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.)

Versuch 6.

590 g Pferdefleisch.

Kupfercolorimetrie:

2,33 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Versuch 7.

Eine Abkochung aus Pferdefleisch wurde in 3 Teile, jeder 290 g Fleisch entsprechend, geteilt und jedem Anteile eine Karnosinlösung, enthaltend 0,33 g Karnosin (= 0,45 g Karnosinkupfer) hinzugefügt, sodann in jeder Fraktion die Karnosinbestimmung gesondert durchgeführt.

a) Kupfercolorimetrie ergab einen Karn.-Geh. entspr. 1,72 g Karnosinkupfer
b) „ „ „ „ „ 1,95 g „
c) Diazocolorimetrie „ „ „ „ 1,57 g „
Mittel: 1,74 g

Nach Abzug der zugesetzten Karnosinmenge 0,45 g

verbleibt 1,20 g Karnosinkupfer

für 290 g Muskel, woraus sich durch Umrechnung als in dem Fleische präformierte Karnosinmenge ergibt:

3,30 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Versuch 8.

950 g frisches Pferdefleisch. Extrakt mit Bleiacetat und Natriumphosphat, das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt, Niederschlag mit Baryt zerlegt. In einem aliquoten Teile Diazocolorimetrie:

2,77 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Hauptmenge mit Silbernitrat und Baryt gefällt, Niederschlag mit Salzsäure zerlegt, Lösung durch Schwefelsäure von Baryt befreit. Diazocolorimetrie:

2,69 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Die Stickstoffbestimmung in der „Karnosinfraktion" (Doppelbestimmung) ergab in diesem Falle mehr, als dem Doppelten des effektiven Karnosingehaltes entsprach. (Auf Karnosin umgerechnet: 6,18 g entspr. 1 kg Fleisch.)

Versuch 9.

Eine größere Portion ganz frischen Pferdefleisches wurde 3 mal mit Wasser ausgekocht, mit Bleiacetat und Natriumphosphat gefällt und das bleifreie Filtrat in 3 Portionen geteilt.

a) Die eine Portion wurde direkt mit Silberbaryt gefällt, der Niederschlag mit Salzsäure zerlegt, die salzsaure Lösung mit einem Überschusse von Baryt versetzt, der Barytüberschuß mit Kohlensäure beseitigt, eingeengt, eine Minute lang mit Kupferhydroxyd gekocht, heiß filtriert. Kupfercolorimetrie:

3,38 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Diazocolorimetrie nach Beseitigung des Kupfers mit H_2S:

2,77 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

b) In der zweiten Portion wurde die Silberbarytfällung vorausgeschickt, der Niederschlag mit Salzsäure zerlegt, die salzsaure Lösung mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag mit Baryt zerlegt. Kupfercolorimetrie:

2,80 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Der Kjeldahlwert der Fraktion, auf Karnosin umgerechnet, betrug in diesem Falle 3,33 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

c) Der dritten Portion wurde Karnosin (durch Zerlegen einer abgewogenen Menge reinen Karnosinkupfers gewonnen) zugesetzt, und zwar 0,63 g entspr. 1 kg Fleisch und nach Phosphorwolframsäure- und Silberbarytfällung der Karnosingehalt durch Diazocolorimetrie ausgewertet.

1 kg Fleisch entsprechend fand sich 3,79 g Karnosin, woraus sich nach Abzug der zugesetzten Menge (0,63 g):

3,16 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch

als Gehalt an präformierter Base ergab.

Versuch 10.

935 g Pferdefleisch, Extraktion mit Wasser, Bleifällung. Im Filtrate erst Silberbarytfällung, dann Phosphorwolframsäurefällung des Karnosins. Kupfercolorimetrie:

2,91 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Der entsprechende Kjeldahlwert betrug 5,91.

Versuch 11.

Frisches Schweinefleisch, 2 Portionen zu 128 und 200 g wie in Versuch 10 verarbeitet. Die Kupfercolorimetrie ergab

a) 3,38 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.
b) 2,71 g „ „ „ „

(Die entsprechenden Kjeldahlwerte der Fraktion betrugen 3,52 bzw. 3,20 g (Mittel 3,36) Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.)

Versuch 12.

400 g ganz frisches Schweinefleisch in 200 Portionen geteilt; jede getrennt, aber parallel verarbeitet (wie Versuch 10).

Kupfercolorimetrie:

a) 2,91 g b) $\left.\begin{matrix}3{,}35\text{ g}\\2{,}89\text{ g}\end{matrix}\right\}$ Mittel 3,12 g Karnosin entspr. 1 kg Fleisch.

Diazocolorimetrie:

a) 2,89 g b) 3,01 g „ „ 1 „ „

Wir lassen nunmehr eine tabellarische Zusammenstellung der mitgeteilten Versuchsergebnisse folgen (S. 185).

Ein Blick auf die nebenstehende Tabelle belehrt uns darüber, daß es durchaus unzulässig ist, den Stickstoffgehalt der „Karnosinfraktion“ in seiner Gesamtheit auf das Karnosin als solches zu beziehen. Die Fraktion enthält vielmehr zweifellos, und zwar bald spärlich, bald sehr reichlich, eine vom Karnosin verschiedene basische Substanz, über deren Natur wir nichts Näheres auszusagen vermögen. Es ist wahrscheinlich, daß ein Pikrolonat dieser Substanz sich in den Versuchen von M. Mauthner teilweise den Rohkrystallisationen des Karnosinpikrolonates beigemengt und die Ausbeute an letzterem scheinbar vermehrt hat.

Man könnte auch daran denken, daß jene unbekannte Substanz, die in den „Karnosinfraktionen“ sich dem Karnosin

beimengt und deren Anwesenheit auch bereits Gulewitsch aufgefallen war, vielleicht ein Zersetzungsprodukt des Karnosins sei. Die in praxi unvermeidliche nachträgliche Schwärzung der Silberbarytniederschläge, insoweit dieselben nicht aus reinen Karnosinlösungen, vielmehr aus Fleischabkochungen gefällt werden, legt einen solchen Gedanken immerhin nahe. Bestimmte Anhaltspunkte zugunsten einer solchen Annahme haben sich aber bisher nicht ergeben. Auch spricht der Umstand dagegen, daß auch dort, wo die Silberbarytfällung ganz vermieden worden war (vgl. Versuch 1 und 2), die gewöhnlichen colorimetrischen Werte resultierten.

(Alle Zahlenangaben beziehen sich auf den Gehalt von 1 kg feuchten Muskels an freiem Karnosin.)

Versuch Nr.	Diazo-colorimetrie	Kupfer-colorimetrie	Mittel	Kjeldahlwert auf Karnosin umgerechnet
1	2,84 2,78	—	2,81	—
2	2,85 2,16	2,43	2,48	3,89
3	2,08	2,89	2,46	2,91
4	1,99	2,31	2,15	5,60
5	2,25 2,20	1,80	2,08	3,84
6	—	2,33	2,33	—
7	—	3,30	3,30	—
8	2,77 2,69	—	2,73	6,18
9	2,77 3,16	3,38 2,80	3,03	3,33
10	—	2,91	2,91	5,91
11	—	3,38 2,71	3,05	3,36
12	2,89 3,01	2,91 3,12	2,98	—
	2,60	2,79	2,69	4,38

Was die absolute Menge Karnosins, die im Muskel enthalten ist, betrifft, wird man angesichts des Umstandes, daß bei den zahlreichen Prozeduren Verluste wohl schwerlich ganz vermieden werden können, mit der Annahme kaum fehlgehen, daß die höheren Zahlenwerte unserer Analysen der Wahrheit näher kommen dürften als die niederen, und daß sich der Karnosingehalt der Säugetiermuskeln um 0,3 % herum bewegen dürfte.

IV.

Versuche zur Abscheidung des Karnosins in Gestalt der krystallisierten Kupferverbindung[1]).

Wir haben sehr viel Mühe auf Versuche verwandt, das Karnosin aus den „Karnosinfraktionen" möglichst vollständig in Form der durch ihre Schwerlöslichkeit und Krystallisationsfähigkeit ausgezeichneten Kupferverbindung zur Abscheidung zu bringen.

Wir gingen dabei zunächt einfach derart vor, daß wir „Karnosinfraktionen" nach Auswertung des Karnosingehaltes auf kupfercolorimetrischem Wege (also nach Überführung des Karnosins in seine Kupferverbindung durch Kochen mit Kupferhydroxyd oder Kupfercarbonat) am Wasserbade oder im Vakuum bei höherer Temperatur oder auch im Faustschen Abdampfapparate bei Zimmertemperatur eindunsteten. Wir hatten zunächst eine Reihe von Fehlversuchen zu verzeichnen, indem die Krystallisation des Karnosinkupfers entweder ganz ausblieb oder nichts anderes resultierte als ein homogener, grünlichblauer Sirup oder Firniß. Oder aber wir beobachteten zwar eine Abscheidung der typischen dunkelvioletten Krystalle; doch war die Ausbeute stets so gering, daß dieselbe nur etwa $^1/_4$ oder $^1/_8$ der erwarteten Menge gleichkam. Daneben resultierte eine reichliche Menge des grünlich-blauen Sirups, der in keiner Weise mehr zur Krystallisation gebracht werden konnte.

Als wesentliche Ursache dieser Mißerfolge hat sich späterhin die hochgradige Zersetzlichkeit des Karnosinkupfers bei Gegenwart gewisser Verunreinigungen herausgestellt. Während man eine Lösung chemisch reinen Karnosinkupfers in Ammoniak ruhig am Wasserbade eindampfen kann, ohne eine Zersetzung befürchten zu müssen, genügt es, das unmittelbar aus der Rohfraktion des Karnosins hergestellte gelöste Karnosinkupfer etwas längere Zeit einer erhöhten Temperatur auszusetzen, um die Umwandlung der rein violetten krystallisabeln Verbindung in ein mehr grünlich gefärbtes unkrystallisables Produkt zu bewerkstelligen. Es war also

[1]) Vgl. diesbezüglich auch die Angaben von Marie Mauthner, l. c. S. 886—889.

durchaus verfehlt, wenn wir, in der irrigen Meinung befangen, es sei dies im Interesse einer vollständigen Umsetzung des Karnosin in seine Kupferverbindung erforderlich, unsere Roh-Karnosinfraktionen etwa $^1/_2$ Stunde lang oder länger nach Zusatz des Kupferhydroxyds oder des Kupfercarbonates im lebhaften Sieden erhielten. Wir haben uns späterhin durch colorimetrische Versuche davon überzeugt, daß sich die Umsetzung des Karnosins in seine Kupferverbindung tatsächlich in der Siedehitze sehr schnell, in der Regel innerhalb 1—2 Minuten, vollzieht und daß jedes längere Erhitzen von Übel ist. So ist uns beispielsweise eine große Karnosinfraktion aus Liebigschem Fleischextrakt unrettbar verloren gegangen, als wir das Kochen der dunkelblauviolett gewordenen Flüssigkeit bei Gegenwart von Kupferhydroxyd etwa $^1/_4$ Stunde fortsetzten: Wir sahen die schöne reintönige Färbung in ein schmutziges Grün übergehen, und es ist nachher nicht gelungen, auch nur einen einzigen Karnosinkupferkrystall aus der Lösung zu gewinnen.

Unsere Resultate wurden besser, wenn sie auch weit davon entfernt blieben, quantitativ zu sein, als wir diese Fehlerquelle vermieden und die Kochdauer bei Gegenwart von Kupferhydroxyd oder Kupfercarbonat unter colorimetrischer Kontrolle auf das unumgänglich erforderliche Maß einschränkten.

Einige Beispiele mögen dies illustrieren:

Versuch 3 (s. o.).

Die rohe Kupferkarnosinlösung wurde erst durch Vakuumdestillation, dann im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur eingeengt. Die Ausbeute an auskrystallisiertem Karnosinkupfer entsprach

1,60 g Karnosin für 1 kg Fleisch.

Versuch 7a.

Die durch Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags (nach Erledigung der Silberbaryt-Prozedur) gewonnene Roh-Karnosinfraktion wurde eingedampft, in 50 cmm Wasser aufgenommen und 1 Minute lang mit Kupferhydroxyd gekocht. Ein Teil der tiefblauen Lösung wurde heiß filtriert, colorimetriert (gegen eine 0,5%ige Standardlösung von Karnosinkupfer), sodann neuerlich eine Messerspitze Kupferhydroxyd hinzugefügt, wiederum 1 Minute im Kochen erhalten, filtriert und konstatiert, daß nunmehr keine weitere Zunahme der Blaufärbung wahrnehmbar war. Beim Erkalten begann in der blauen Flüssigkeit bald

eine Abscheidung von Karnosinkupfer-Krystallen. Es wurde nunmehr das vielfache Volumen Acetons hinzugefügt, wobei die Kupferverbindung des Karnosins in Gestalt eines hellblauen Niederschlages ausfiel, während die überstehende Flüssigkeit hellgrün gefärbt erschien. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in einem geringen Volumen konzentrierten Ammoniaks gelöst und die tiefblaue Lösung ins Vakuum über Schwefelsäure zum Trocknen gebracht. Nach Hinzufügen von wenig Wasser wurde filtriert. Die Mutterlauge lief blaugefärbt ab. Der Rückstand bestand aus schön violett gefärbten Krystalldrusen von Karnosinkupfer in einer Ausbeute, entsprechend

1,77 g Karnosin für 1 kg Fleisch.

Versuch 10.

Die nach Zerlegung des Phosphorwolframsäure-Niederschlages erhaltene Rohkarnosinlösung wurde zweimal, je 1 Minute lang mit Kupferhydrat gekocht; beim zweiten Male war keine Zunahme der Blaufärbung mehr bemerkbar. Die blaue Lösung wurde nunmehr durch einen vorgewärmten Luftstrom im Faustschen Verdunstungsapparate zur Trockne gebracht. Es resultierte ein blauer Sirup, in dem beim Verrühren mit ein wenig konzentriertem Ammoniak alsbald Krystallisation begann, worauf das Ammoniak im Vakuum über Schwefelsäure entfernt wurde. Die schließlich resultierende Ausbeute an Karnosinkupferkrystallen entsprach

1,42 g Karnosin für 1 kg Fleisch.

Versuch 11.

Analog durchgeführt. Die Ausbeute an Karnosinkupfer entsprach

1,88 g Karnosin für 1 kg Fleisch.

Es war also bei diesen Versuchen immerhin gelungen, $^1/_2$ bis $^2/_3$ des colorimetrisch ermittelten Karnosingehaltes in Gestalt der krystallisierten Karnosinkupferverbindung wiederzufinden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß sich die mitgeteilten Zahlenwerte auf die Rohkrystallisationen von Karnosinkupfer beziehen. Krystallisiert man diese aus Ammoniak um, so bleibt noch eine (allerdings geringfügige) Menge einer verunreinigenden Substanz auf dem Filter zurück.

Unsere Hoffnung, ein quantitatives Verfahren auf die Abscheidung der Karnosinkupferkrystalle aufzubauen, ist vollkommen zunichte geworden, als wir den Versuch machten, ob denn reines Karnosin, das wir durch Zerlegung einer abgewogenen Menge reinen Karnosinkupfers bereitet hatten, nachdem es die

Prozeduren der Silberbaryt- und Phosphorwolframsäurefällung durchgemacht hat, quantitativ in Gestalt von Krystallen von Karnosinkupfer wiedergewonnen werden kann. Die colorimetrische Karnosinausbeute läßt allerdings in diesem Falle, wie schon früher (Abschnitt II) auseinandergesetzt wurde, nichts zu wünschen übrig. Versucht man nun aber, nach Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages das Karnosin in das Kupfersalz überzuführen und dieses, allerdings ohne besondere Vorsicht, einzudampfen, so ist die Abscheidung der Karnosinkrystalle, wie schon die intensive unreine Färbung der Mutterlauge lehrt, eine keineswegs glatte und quantitative. In einem Versuche betrug die Ausbeute 0,31 g statt 0,53 g, in einem anderen 0,15 g statt 0,30 g Karnosinkupfer. Man braucht also gar nicht erst die Wirkung organischer Verunreinigungen heranzuziehen; offenbar genügt die Anwesenheit gewisser anorganischer Beimengungen, um die Zersetzung des Karnosinkupfers katalytisch zu beschleunigen. Der naheliegende Gedanke, daß vielleicht das Barium, welches sich stets reichlich in Rohfraktionen des Karnosins findet, das schuldige Agens sei, veranlaßte uns, dasselbe durch tropfenweisen Zusatz von Na_2CO_3 vor dem Kochen mit Kupferhydroxyd zu entfernen; doch wurden die Versuchsergebnisse davon nicht wesentlich beeinflußt.

Nur in einem einzigen Falle (Versuch 12) ist es uns — ohne daß wir anzugeben vermöchten, welchem Umstande wir dies verdanken — gelungen, aus einer Karnosinfraktion annähernd die ganze, darin colorimetrisch ausgewertete Karnosinmenge in Gestalt der Karnosinkupferkrystalle wiederzufinden.

Die durch 2 Minuten lang dauerndes Kochen gewonnene blaue Lösung wurde in diesem Falle im Faustschen Abdampfapparate abgeblasen. Es erfolgte direkt die Krystallisation in gut ausgebildeten, charakteristischen Formen; die Krystalle wurden auf einem kleinen Nutschfilter gesammelt. Die abfließende Mutterlauge (die bei der Mehrzahl unserer Versuche stark blau oder blaugrün gefärbt erschien) war in diesem Falle so schwach gefärbt, daß direkt ersichtlich war, fast die gesamte blaue Substanz sei in Form der Krystalle zur Abscheidung gekommen. Die ausgewaschene Krystallmasse wurde

direkt auf dem Filter in Ammoniak gelöst und die Lösung colorimetrisch durch Vergleich mit einer Standardlösung von Karnosinkupfer ausgewertet. Die Krystallausbeute entsprach

2,60 g Karnosin für 1 kg Fleisch

während die colorimetrische Bestimmung (Mittel aus vier gut übereinstimmenden Analysen)

2,98 g Karnosin für 1 kg Fleisch

ergeben hatte.

Trotzdem dieses Resultat ein ganz ausnahmsweise günstiges war, war es für uns doch von besonderem Werte, da es unsere letzten Zweifel darüber beseitigen mußte, ob jene Substanz, welche wir auf colorimetrischem Wege als Karnosin auswerteten, wirklich Karnosin und nichts anderes sei.

In bezug auf die Natur jenes Umwandlungsproduktes, das so leicht aus dem Karnosinkupfer entsteht, ist schließlich die Tatsache von Bedeutung, daß es aus ammoniakalischer Lösung durch Alkoholzusatz in Gestalt amorpher grünlicher Flocken gefällt wird, während das Karnosinkupfer in Lösung bleibt. Es ist uns so wiederholt gelungen, in teilweise zersetzten und grünlich gefärbten Karnosinkupferlösungen ihre ursprüngliche rein blau-violette Färbung und ihre Krystallisationsfähigkeit wieder herzustellen.

V.

Vorgang zur colorimetrischen Auswertung des Karnosingehaltes einer Fleischprobe.

Es dürfte sich nunmehr empfehlen, eine genauere Schilderung jenes Vorganges folgen zu lassen, der auf Grund unserer gesamten Erfahrungen zweckmäßiger Weise einzuhalten ist, wenn es sich darum handelt, den Karnosingehalt einer Fleischprobe, so gut es nach dem gegenwärtigen Stande des Wissens eben möglich ist, zu ermitteln. Daß die Fehlergrenzen dieser Methode nicht allzueng gezogen sind und daß das Verfahren sicherlich nach vielen Richtungen hin verbesserungsbedürftig erscheint, geht aus dem früher Mitgeteilten zur Genüge hervor.

1. Es empfiehlt sich, von der möglichst frischen Fleischprobe 200 g in Arbeit zu nehmen. Der abgewogene, feinge-

hackte Fleischbrei wird, am bequemsten in einer emaillierten Blechschale, 4 mal mit Wasser ausgekocht und das Filtrat auf etwa $^1/_4$ Liter eingedampft.

2. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mit ca. 50 ccm $10^0/_0$iger Bleiacetatlösung und mit ca. 20 ccm $10\,^0/_0$iger Natriumphosphatlösung ($Na_2\,HPO_4 + 12\,H_2O$) versetzt. In der Regel setzt sich dann der Niederschlag gut ab. Andernfalls muß man dies durch wechselnde Zusätze beider Reagenzien zu erzielen suchen. Schließlich wird filtriert und gut nachgewaschen. Das Filtrat muß frei von Blei sein und soll einen geringen Überschuß von Natriumphosphat enthalten. (Einen großen Bleiüberschuß von vornherein zuzusetzen, ist schon deswegen unzweckmäßig, weil ein solcher einen Teil der gefällten Kolloide wieder löst und die Bildung kolloider, schwer filtrierbarer Suspensionen begünstigt).

3. Das Filtrat wird nunmehr mit soviel einer 10 proz. Silbernitratlösung versetzt, bis eine mit dem Glasstabe in ein Uhrglas mit Barytwasser übertragene Probe durch das Auftreten einer bräunlichen Färbung einen Silberüberschuß anzeigt. Sodann wird die Flüssigkeit mit fein gepulvertem Ätzbaryt gesättigt, derart daß auch nach kräftigem Umrühren und einigem Stehen ein Bodensatz des letzteren ungelöst bleibt. Man läßt nun einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen, bevor man den dunkel gefärbten Niederschlag abfiltriert. Es empfiehlt sich nicht, eine völlige Klärung der überstehenden Flüssigkeit abzuwarten[1]). Der Siberbarytniederschlag wird auf einem Nutsch-

[1]) Während die Silberbarytfällung einer reinen Karnosinlösung eine helle Färbung aufweist und nach Zerlegen mit Salzsäure eine Abscheidung von Chlorsilber vom gewöhnlichen Aussehen gibt, dunkeln die analogen Niederschläge in Fleischabkochungen sehr schnell nach, während gleichzeitig die überstehende Flüssigkeit eine schwärzliche Färbung annimmt. Zerlegt man eine solche Fällung mit Salzsäure, so bleibt nicht typisches Chlorsilber, vielmehr eine schwarze Substanz ungelöst zurück (Beimengung von metallischem Silber?). Läßt man die von dem Silberbarytniederschlage abfiltrierte schwärzliche Flüssigkeit längere Zeit bei Zimmertemperatur stehen, so klärt sie sich unter Abscheidung dunkler Flocken, die aber, wie wir uns zu wiederholten Malen überzeugt haben, kein Karnosin enthalten. Wir empfehlen, den Silberbarytniederschlag schon nach einigen Stunden abzufiltrieren, da wir bemerkt zu haben glauben, daß er bei langdauerndem Stehen unter Umständen Karnosin an die überstehende Flüssigkeit verlieren kann.

filter gesammelt, mit gesättigtem Barytwasser gewaschen, sodann in einer Reibschale durch Verreiben mit einem Überschusse von Salzsäure (Prüfung mit Kongopapier) zerlegt. Man fügt etwas verdünnte Schwefelsäure zur Fällung des vorhandenen Baryts hinzu, saugt ab und wiederholt das Verreiben des Niederschlages mit Salzsäure noch einmal.

4. Das saure Filtrat wird nunmehr mit einem Überschusse von Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag abgenutscht, mit dem verdünnten Fällungsmittel kurz nachgewaschen, sodann in einer Reibschale mit feingepulvertem Ätzbaryt und wenig Wasser verrieben, nach halbtägigem Stehen filtriert (nachdem man sich davon überzeugt hat, daß ein Barytüberschuß vorhanden ist), das Filtrat durch Kohlensäure von diesem letzteren befreit und zur Trockne gedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen, filtriert und im Meßkolben auf 200 ccm aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird sodann in zwei gleiche Hälften geteilt, von denen die eine für die Diazocolorimetrie, die andere für die Kupfercolorimetrie bestimmt ist. Je 1 ccm der Flüssigkeit entspricht 1 g Fleisch.

5. Der Diazocolorimetrie muß die Beseitigung des in der Flüssigkeit befindlichen, organisch gebundenen Baryts durch Natriumcarbonat vorangehen. Sodann wird mit Salzsäure neutralisiert und die colorimetrische Bestimmung genau wie mit einer Histidinlösung unter Einhaltung der Vorschriften von Weiß und Ssobolew durchgeführt. Als Standardlösung dient entweder eine Lösung von reinstem Histidinchlorhydrat 0,01 % oder aber eine Lösung von Karnosin 0,01 %, die durch Zerlegung einer abgewogenen Menge wiederholt umkrystallisierten Karnosinkupfers mit Schwefelwasserstoff bereitet wird.

6. Die Kupfercolorimetrie wird in folgender Art durchgeführt: 100 ccm der Flüssigkeit werden in einen Kolben mit aufgesetztem Rückflußkühler gebracht. Man fügt eine Messerspitze Kupferhydroxyd (Kahlbaum) hinzu, erhitzt mit Hilfe eines Babobleches schnell zum Kochen, erhält eine Minute lang im Sieden und filtriert eine Probe in einem Heißwassertrichter durch ein trockenes Filter ab. Nunmehr wird die Färbungsintensität der blauen Flüssigkeit mit Hilfe eines Colorimeters nach Dubosq mit einer Karnosinkupferlösung 0,5 % verglichen. Sodann wird die Probe in den Kolben zurückge-

gossen, noch etwas Kupferhydroxyd zugefügt, wieder eine Minute gekocht, eine Probe filtriert und colorimetriert. Sollte die Färbungsintensität der Lösung beim zweiten Kochen noch zugenommen haben, so muß noch in gleicher Weise ein drittes Mal vorgegangen werden. Man kann schließlich die ganze blaue Flüssigkeit abfiltrieren, nachwaschen, das Volumen des Filtrates abmessen und zur Kontrolle eine weitere colorimetrische Bestimmung vornehmen.

Der Karnosingehalt der Muskelprobe ergibt sich aus der Mittelzahl des diazocolorimetrisch und des kupfercolorimetrisch ermittelten Wertes.

Einen ganz analogen Vorgang wird man einzuhalten haben, wenn man die Gewinnung der Karnosinkupfer-Verbindung aus einer größeren Fleischmenge versuchen will. Daß man selbst bei Vermeidung aller Fehler in der Regel mit einer Ausbeute, die nur etwa der Hälfte der vorhandenen Karnosinmenge entspricht, sich wird begnügen müssen, ist schon früher gesagt worden. Man geht dabei am besten derart vor, daß man die mit Kupfer saturierte blaue Lösung im Faustschen Abblaseapparat zur Trockne bringt, den Rückstand mit ein wenig konzentriertem Ammoniak anrührt und ins Vakuum über Schwefelsäure stellt. Die abgeschiedenen Krystalle werden abfiltriert, gewaschen und aus Ammoniak umkrystallisiert.

Handelt es sich um die Darstellung des Karnosins aus großen Fleischmengen, so dürfte man, wie wir glauben, am besten derart vorgehen, daß man das Karnosin als Nitrat nach dem Vorgange von Gulewitsch zur Abscheidung bringt.

Zusammenfassung.

1. Die sogenannte „Karnosinfraktion" des Fleischextraktes, d. h. jene Fraktion basischer Substanzen, welche (nach vorausgegangener Beseitigung kolloider Produkte durch Bleiacetat) durch Silberbarytfällung niedergeschlagen werden kann, enthält neben dem Karnosin wechselnde, zuweilen aber beträchtliche Mengen einer anderen Substanz unbekannter Art, derart, daß es unzulässig erscheint, aus dem Stickstoffgehalte der „Karnosinfraktion" Rückschlüsse auf den wirklichen Karnosingehalt derselben zu ziehen.

2. Dagegen wird man durch Anwendung zweier colorimetrischer Methoden in den Stand gesetzt, auf den Karnosingehalt einer Fleischprobe zu schließen. Da diese beiden Methoden auf völlig verschiedenen Prinzipien beruhen, kontrollieren sie sich gegenseitig.

3. Die eine dieser Methoden beruht auf der Farbenreaktion, welche das Karnosin vermöge des in seinem Moleküle enthaltenen Histidinkomplexes mit Diazobenzolsulfosäure gibt. Die kürzlich von Weiß und Ssoboleff in diesem Laboratorium ausgearbeitete Methode zur colorimetrischen Bestimmung des Histidins erwies sich auch auf das im Karnosin organisch gebundene Histidin direkt anwendbar.

4. Die andere Methode beruht darauf, daß man durch Kochen einer „Karnosinfraktion" mit Kupferhydroxyd das Karnosin in seine schön violett gefärbte Kupferverbindung überführen und die Intensität der Färbung mit einer Standardlösung von Karnosinkupfer vergleichen kann.

5. Es ist uns in einem Falle gelungen, nahezu die Gesamtmenge der gefärbten Kupferverbindung aus der Lösung der Karnosinfraktion in Form der sehr charakteristischen, in Wasser schwer löslichen Krystalle von Karnosinkupfer wiederzugewinnen und so die Identität der kupferlösenden Substanz mit dem Karnosin zu beweisen. In der Regel gelingt es aber nur, einen Bruchteil ($^1/_2$ bis $^2/_3$) des vorhandenen Karnosins in Krystallform zu gewinnen, was mit der hochgradigen Zersetzlichkeit der noch nicht völlig gereinigten Kupferverbindung zusammenhängt.

6. Die beiden colorimetrischen Methoden führen in guter Übereinstimmung zu dem Resultate, daß in den „Karnosinfraktionen" je einem Kilo Fleisch entsprechend 2 bis 3 g (im Mittel 2,7 g) Karnosin nachzuweisen sei. Da die Herstellung der Karnosinfraktionen aber gewisse unvermeidliche Verluste mit sich bringt, dürfte man wohl mit einer Bewertung des Karnosingehaltes der untersuchten Fleischarten (Pferde- und Schweinefleisch) um etwa 0,3 % herum der Wahrheit am nächsten kommen.

Über die quantitative Bestimmung der Oxyproteinsäurefraktion im normalen und pathologischen Harne.

Von

Rempei Sassa.

(Ausgeführt unter der Leitung des a. ö. Prof. Dr. Otto von Fürth im Physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 7. Mai 1914.)

I. Einleitung.

Nachdem W. Ginsberg[1]) im hiesigen Institute eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Substanzen der Oxyproteinsäure-Gruppe[2]) im Harne ausgearbeitet und mit Hilfe derselben zahlenmäßig nachgewiesen hatte, daß weitaus der Hauptanteil des „Azote non dosé" im Harne, des unbestimmten N-Restes, die Gruppe der Oxyproteinsäuren entfällt, ist die Erforschung auf der Ausscheidungsbedingungen dieser Substanzen Gegenstand eingehender Untersuchungen geworden.

Die von Ginsberg angegebene Vorschrift zur Oxyproteinsäurenbestimmung (Methode B) lautet wie folgt: „1000 ccm Harn (dessen Gesamt-N-Gehalt vorher nach Kjeldahl bestimmt worden war) werden mit heißgesättigter Bariumhydroxydlösung im Überschuß gefällt, durch Kohlensäure vom Barytüberschuß befreit, ein aliquoter Teil heiß filtriert, auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup eingeengt und dieser nach dem Prinzip von Mörner-Sjöqvist mit Ätheralkohol (1 : 2) erschöpft. Das wird dadurch erreicht, daß der Sirup, mit der 20fachen Volummenge Ätheralkohol versetzt und gut durchgeschüttelt, 24 Stunden in verschlossenem Gefäß stehen bleibt, dann die Flüssigkeit von dem abgesetzten Niederschlag oder Sirup abgegossen, der Rückstand mehrmals (eventuell auf dem Filter) mit Ätheralkohol gewaschen und dann in Wasser gelöst wird. Diese Fraktion bezeichne ich als „Barytfraktion". In ihr sind Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak, Kreatin, Kreatinin, Hippur-

[1]) W. Ginsberg, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **10**, 411, 1907.

[2]) Literatur über Oxyproteinsäuregruppe vgl. Ginsberg (l. c.), F. N. Schultz, Neubauer-Hupperts Analyse des Harns, XI. Aufl., **1913**, 1234.

säure nicht vorhanden, sondern anscheinend nur die Bariumsalze der drei Oxyproteinsäuren und ein derzeit noch unbekannter N-haltiger Rest. Die Gesamtheit der Oxyproteinsäuren wird durch Quecksilberacetat unter Sodazusatz ausgefällt und ihr Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt."

Nach Ginsberg[1]) enthält der normale menschliche Harn 3,1 bis 5% des Gesamt-N in Form des Oxyproteinsäure-N und dieses Verhältnis verschiebt sich auch in pathologischen Harnen nicht wesentlich. Nach Ginsbergs Methode fand S. Simon[2]) 10% Oxyproteinsäure-N im Harn Neugeborener und älterer gesunder Kinder.

Gleichzeitig veröffentlichte W. Gawinski[3]) eine Methode, die auf dem gleichen Prinzip wie die Ginsbergsche beruht, sich aber von dieser dadurch unterscheidet, daß dieser Autor eine Vorbehandlung des eingeengten Harns mit Schwefelsäure und Alkohol — die schon Bondzynski und Gottlieb[4]) bei der Darstellung der Oxyproteinsäuren angewandt hatten — in seine Bestimmungsmethode einführte, und außerdem den absoluten Alkohol statt des Ätheralkohols zur Entfernung der alkohollöslichen Beimengungen verwandte. Schließlich ist auch zu beachten, daß Gawinski in der Annahme, der N seines „Barytsirups" sei mit Quecksilberacetat und Soda quantitativ fällbar, von dieser Fällung absah.

Gawinskis Methode führte zum Teil zu einer Bestätigung von Ginsbergs Zahlenangaben. Jener fand nämlich in normalem Menschenharn 4,5 bis 6,8% „Protein-N" bei gemischter und Fleischkost, 2,9% bei Milchkost; ferner konstatierte er eine starke Vermehrung des „Protein-N" sowohl bei den meisten Typhuskranken (in 4 von 6 untersuchten Fällen) — einmal sogar bis 14,69% — als auch bei einem leberkranken Individuum mit Ikterus.

Später ersetzten H. Salomon und P. Saxl[5]) die Anordnung Ginsbergs, die Barytfraktion zu einem dünnen Sirup einzudampfen, durch die Vorschrift, die Barytfraktion auf ein Volumen von 40 bis 50 ccm einzuengen. Sie fällten nämlich die auf 40 bis 50 ccm eingedampfte Barytfraktion mit 1000 ccm Ätheralkohol und filtrierten die ausgeschiedenen oxyproteinsauren Salze nach 24 Stunden ab. Da mit ihrer Methode nach dieser Behandlung in dem Filtrate keine Oxyproteinsäuren mehr zu bestimmen waren, so glaubten sie, auf diese Weise ohne Verlust die Barytfraktion von N-haltigen Beimengungen bequemer befreien zu können.

Mit dieser Modifikation ermittelten nun Salomon und Saxl im krassen Widerspruche zu den Angaben Ginsbergs und Gawinskis einen sehr geringen Gehalt an Oxyproteinsäure-N (1 bis 2% des Gesamtstickstoffes) für normalen, bzw. nicht carcinomatösen Harn. Dagegen

[1]) Ginsberg, l. c.

[2]) Simon, Zeitschr. f. Kinderheilk. 2, 1, 1911.

[3]) Gawinski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 454, 1908/09.

[4]) Bondzynski und Gottlieb, Centralbl. f. med. Wiss. 1897, 577.

[5]) Salomon und Saxl, Beiträge z. Carcinomforschung, I. Heft. 1910 (aus d. I. med. Klinik in Wien).

fanden sie relativ große Zahlen (2,5 bis 3,5%) bei carcinomatösen und graviden Individuen und deuteten diese Vermehrung als ein charakteristisches Sympton der Krebskrankheit. Ihre Behauptung wurde von K. Kondo[1]) bestätigt, von Domanski[2]), Tanfani[3]) u. a. aber bestritten.

Die genannten drei Methoden beruhen alle auf demselben Prinzipe und bezwecken — nach der von Bondzynski und Gottlieb gegebenen Definition — jene Gruppe der N- und S-haltigen Verbindungen (resp. deren N-Gehalt) quantitativ zu bestimmen, die saurer Natur sind, in Wasser lösliche, in Alkohol unlösliche Barytsalze geben und durch Quecksilberacetat bei schwach alkalischer Reaktion fällbar sind.

Es hat ferner F. Erben[4]) eine Methode angegeben, um eine bestimmte Fraktion der Oxyproteinsäuren zu ermitteln. Da er es für unmöglich hielt, die erst bei sodaalkalischer Reaktion fällbare Oxyproteinsäure von Aminosäuren zu trennen, so verzichtete er auf die Bestimmung der gesamten Oxyproteinsäuregruppe und versuchte nur, die aus der Barytfraktion mit Quecksilberacetat bei schwach essigsaurer Reaktion fällbaren Substanzen (Alloxy- und Antoxy-Proteinsäure) zu ermitteln.

Wenn man alle bisher vorliegenden Angaben zusammenfaßt, so drängt sich der Eindruck auf, daß die Methodik der qnantitativen Bestimmung der Oxyproteinsäuren im Harn noch keineswegs zu einem Abschlusse gelangt ist. Es ist ohne weiteres verständlich, daß das Erbensche Verfahren eine geringere Ausbeute als das Ginsbergsche gibt, da es ja nicht die Ermittlung der Gesamtmenge dieser Gruppe anstrebt. Dagegen stehen die Angaben Ginsbergs und Gawinskis einerseits und diejenigen Salomons und Saxls andrerseits in eklatantem Widerspruche, da alle diese Verfahren eine quantitative Ausbeute in bezug auf diese Substanzen anstreben.

Haben Ginsberg und Gawinski den Harnstoff und andere N-haltige Harnsubstanzen mitbestimmt, wie es Salomon und Saxl glauben? Hat Ginsberg alle Aminosäuren mitgefällt, wie Erben ihm vorwirft? Haben Salomon und Saxl wirklich die gesamte Oxyproteinsäurenfraktion bestimmt? Diese Fragen zu lösen, eventuell eine exakte Bestimmungsmethode der Oxyproteinsäuren auszuarbeiten (ohne uns aber auf eine Aufteilung der einzelnen Oxyproteinsäurenfraktionen einzulassen), setzten wir uns zum Ziele der vorliegenden Untersuchungen.

[1]) K. Kondo, Beitr. z. Carcinomforschung, **1911** (aus d. I. med. Klinik in Wien).

[2]) W. Domanski, Monatsschr. f. Psych. u. Neurol. **31**, 53, 1912.

[3]) G. Tanfani, Zit. Biochem. Centralbl. **15**, 87.

[4]) F. Erben, Intern. Beitr. z. Pathol. u. Ther. d. Ernährungsstörungen, 2, 251, 1911; ferner Prager med. Wochenschr. **1912**, 427.

II. Methodik.

1. Ausführungsvorschrift.

Auf Grund der bei Vorversuchen und Überprüfungen der bisherigen Methoden gewonnenen Erfahrungen haben wir folgende Vorschrift zur quantitativen Bestimmung des Oxyproteinsäure-N festgestellt:

200 bis 1000 ccm Harn (dessen Gesamt-N-Gehalt bekannt ist) werden unter Zusatz von ein wenig Essigsäure auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingeengt, nach dem Erkalten mit verdünnter Schwefelsäure bis zur Blaufärbung von Kongopapier angesäuert (ca. 20 bis 25 ccm H_2SO_4 10% für 1 Liter Harn), dann mit dem 3- bis 4fachen Volumen von Alkohol (95%) versetzt. Die ausgeschiedene Masse (schwefelsaure Alkalisalze) wird mit Hilfe eines Saugfilters vom klaren Filtrat abgetrennt und mit verdünntem Alkohol (1 Teil Wasser und 3 bis 4 Teile Alkohol) nachgewaschen. Das vereinigte Filtrat wird zuerst mit dem 2fachen Quantum Wassers verdünnt, dann mit fein gepulvertem Bariumhydroxyd im Überschuß gefällt und durch Kohlensäure vom Barytüberschuß befreit. Das ganze Gemisch engt man, ohne zu filtrieren, auf dem Wasserbade bis auf ein kleines Volumen ein. Hierauf wird der Niederschlag (auch harnsaures Barium enthaltend) vom klaren Filtrate abgetrennt und mit kohlensäurefreiem Wasser nachgewaschen. Das Filtrat samt dem Waschwasser wird wiederum bis zum dicken Sirup eingeengt, wobei die Flüssigkeit in der Regel bis zum Ende klar bleibt. Man vermengt dann den warmen Sirup mit geglühter Kieselgur, zerreibt die Masse zu einem feuchten Pulver, das nunmehr in 300 bis 1000 ccm Ätheralkohol (1 Teil Äther und 2 Teile Alkohol 95%) — je nach dem Quantum des Pulvers — in einem geschlossenen Gefäße einen Tag unter häufigem Durchschütteln aufbewahrt wird. Das Pulver wird in Ätheralkohol allmählich entwässert und die Flüssigkeit bleibt für gewöhnlich ganz farblos. Es wird nun mit Ätheralkohol 1 bis 2mal gewaschen, von der Spülflüssigkeit befreit und auf dem Wasserbade getrocknet, um die Masse hierauf im Mörser zum feinsten Pulver zu zerreiben.

Um das erhaltene Pulver von alkohollöslichen Beimengungen (und zwar in erster Linie vom Harnstoff) zu befreien, empfehlen sich folgende zwei Wege:

A. Das Pulver wird entweder mit absolutem Alkohol (99,7 %) allein oder im Verein mit Äther (Äther 1 und absoluter Alkohol 2) unter Rückflußkühlung wiederholt gekocht, bis die Harnstoffreaktion (nach Lüdy) in der Kochflüssigkeit vollkommen negativ ausfällt [1]). Es gelingt dies erst nach 5- bis 8maligem, je einstündigem Kochen mit 150 bis 300 ccm Extraktionsflüssigkeit, vorausgesetzt, daß das jedesmalige Dekantieren, eventuell Abfiltrieren gründlich geschieht.

B. Das Pulver wird im Soxhletschen Apparate mit absolutem Alkohol erst 10 bis 20 [2]) Stunden — je nach dem Quantum des Pulvers — extrahiert, dann einmal getrocknet und neuerdings zerrieben, wiederum im Soxhlet 5 bis 10 Stunden extrahiert, wobei die Wasseranziehung des Alkohols aus der Luft möglichst zu vermeiden ist (der Kühler ist durch ein Chlorcalciumrohr abzuschließen). Es empfiehlt sich demnach, häufig den Alkohol zu wechseln. Beim letzten Extrakte stellt man die Harnstoffprobe an.

Nunmehr wird das Pulver von der Extraktionsflüssigkeit befreit und mit warmem Wasser ausgelaugt. Das Filtrat wird — bei größerer Menge Pulver ist Anwendung eines Saugfilters erforderlich — mit Waschwasser auf ein bestimmtes Volumen (100 bis 200 ccm) gebracht.

Von der so erhaltenen braun gefärbten, schwach alkalisch reagierenden „Barytfraktion“ [3]) wird der Gesamt-N (Baryt-N) und der mit Quecksilberacetat in sodaalkalischer Reaktion fällbare N (Oxyproteinsäure-N) bestimmt. Man nimmt 20 bis 25 ccm Barytfraktion zur Baryt-N-, 40 bis 50 ccm zur Oxyproteinsäure-N- und Rest-N-Bestimmung. Zu diesem Zwecke setzt man Mercuriacetatlösung 20 % und Sodalösung 10 % abwechselnd so lange zu, bis ein dauernd gelb (oder rot) gefärbter Niederschlag auszufallen beginnt. Der Niederschlag wird gewaschen und samt dem Filter kjeldahlisiert. Man tut gut, zur Kontrolle gleichzeitig auch das Filtrat samt Waschwasser zu

[1]) Vgl. die Bemerkungen (s. u.)

[2]) Die maximalen Zahlen gelten für die Operation mit einer größeren Menge (1 Liter) Harn. Eine zu lange Extraktion — bei Gebrauch von absolutem Alkohol — schadet nichts.

[3]) Wir bezeichnen diese wässerige Lösung der Bariumsalze der Oxyproteinsäuren der Kürze halber als „Barytfraktion“ nach Ginsberg, die dem „Barytsirup“ Gawinskis entspricht.

kjeldahlisieren. Der erhaltene Baryt-, Oxyproteinsäure- und Rest-N werden mit dem Gesamt-N verglichen. Der Rest der Barytlösung wird unter Umständen zur Harnstoffbestimmung verwendet. Man benutzt dazu die Xanthydrolreaktion des Harnstoffes (s. die Bemerkungen).

2. Bemerkungen zu diesem Verfahren.

1. Zur Bestimmung sind bei gewöhnlicher Harnkonzentration (mit einem N-Gehalt von ca. 1,0%) wenigstens 200 ccm Harn nötig. Bei konzentriertem Harn kann man auch mit 100 ccm auskommen. Selbstverständlich wird der Operationsfehler um so kleiner, dafür aber die Harnstoffentfernung um so beschwerlicher, eine je größere Harnmenge man anwendet.

2. Die von Gawinski empfohlene Behandlung des eingeengten Harns mit Schwefelsäure und Alkohol dient dazu, einerseits die organischen Säuren (wie Oxyproteinsäuren) von der Bindung mit Kationen (Alkalimetallen) loszureißen und andererseits die Alkalimetalle in der schwerer löslichen Sulfatform möglichst aus der Lösung zu entfernen. Denn die anwesenden Alkalimetalle wirken störend. Das Umgehen dieser Vorbehandlung hat große Verluste zur Folge. (Vergleiche Tabelle II.)

3. Um einen Barytüberschuß durch Kohlensäure zu beseitigen, genügt eine einmalige Durchleitung. Eine abermalige Behandlung des Filtrats mit Kohlensäure, wie sie Salomon und Saxl vorschreiben, gibt keine Ausscheidung mehr, wenn sie das erste Mal in genügendem Ausmaße vorgenommen wurde.

4. Das durch Baryt und Kohlensäure ausgefällte Gemenge filtriert man nicht sofort nach dem Kochen, sondern erst nach starkem Eingengen desselben ab, um einer Ausscheidung der Salze bei der späteren starken Einengung des Filtrats vorzubeugen.

5. Beim Übertragen der mit Kieselgur gemischten Masse von einem Gefäß in das andere haftet der Rückstand ab und zu fest an den Gefäßwänden (besonders beim Gebrauch von zu wenig Kieselgur). Um ihn restlos zu entfernen, wischt man ihn mit Kieselgur — mittels einer Gummifahne — ab, nachdem man mit ein paar Tropfen Wasser befeuchtet hat.

6. Bevor die von oxyproteinsauren Salzen durchtränkte Kieselgur der Alkoholextraktion unterzogen wird, muß man sie wirklich zu ganz feinen Körnern zerreiben.

7. Was die Befreiung der fein gepulverten Kieselgur von alkohollöslichen Beimengungen anbelangt, hat jede der Methoden A und B ihre Vor- und Nachteile. Im allgemeinen ist die A-Methode (wiederholtes Kochen mit absolutem Alkohol allein oder im Verein mit Äther) leistungsfähiger als die B-Methode (Alkoholextraktion im Soxhlet). Während die A-Methode gleichzeitig ein Verschwinden des Harnstoffes im Extrakte wie in der — später erhaltenen — Barytfraktion bewirkt, erreicht die B-Methode nicht immer diesen Zweck. Es kommt nämlich im letzteren Falle ab und zu vor, daß der Harnstoff sich, bei völligem

Fehlen der Harnstoffreaktion im Extrakte, im Rückstande doch wieder nachweisen läßt. Es empfiehlt sich demnach, bei Anwendung der B-Methode doch immer, die gereinigte Kieselgur nochmals in heißem absolutem Alkohol zu suspendieren, eventuell die letztere einige Zeit lang zu kochen und hierauf in diesem Extrakte die Harnstoffprobe anzustellen. Diese Verunreinigung der Barytfraktion mit Harnstoff ist aber immer minimal (vgl. die Zusammensetzung der Barytfraktion), so daß eine quantitative Bestimmung des Harnstoffs in der Barytfraktion und die Substraktion dieses N von dem Baryt- resp. Oxyproteinsäure-N als überflüssig erscheint.

Bei der Anwendung der A-Methode konkurrieren ihrer Zweckmäßigkeit nach wiederum Ätheralkohol (Äther 1 und absoluter Alkohol 2) und absoluter Alkohol miteinander. Die Leistungsfähigkeit beider ist dieselbe. Während aber der Ätheralkohol sich leicht von der sich absetzenden Kieselgur dekantieren läßt, ist bei Anwendung von absolutem Alkohol allein oft Filtration nötig.

Bei Anwendung der Mischung: 1 Teil Äther und 2 Teile Alkohol 95%, als Extraktionsflüssigkeit ist immer die Gefahr vorhanden, daß ein kleiner Teil der Oxyproteinsäuren selbst während der Extraktion mitgelöst wird. Jedenfalls ist der Verlust dabei aber nur gering, so daß die Anwendung des erheblich billigeren Alkohols 95% im Verein mit Äther doch immerhin innerhalb der Grenzen der Brauchbarkeit liegt (vgl. Tabelle I). Dagegen ist der Gebrauch von gewöhnlichem Alkohol (95%) ohne Ätherzusatz sowie auch von mit Kupfersulfat entwässertem Alkohol allein als Extraktionsflüssigkeit durchaus unzulässig (vgl. Tabelle II).

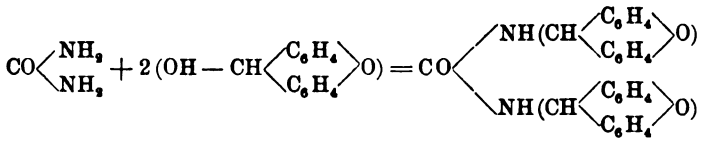
8. Die Harnstoffprobe nach Lüdy[1]). Um in der Extraktionsflüssigkeit die Harnstoffprobe nach Lüdy anzustellen, nimmt man möglichst viel davon (über 50 ccm Filtrat). Zu bemerken ist ferner, daß man diese Probe tunlichst bei Tageslicht anstellen und immer eine frisch bereitete farblose Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin benutzen soll, damit ein spurenweiser Ausfall der Harnstoffreaktion — braun bis braunrot — nicht von vornherein durch eine Gelbfärbung verschleiert wird. Mit dieser Probe konnte ich bis 1 mg Harnstoff in der Barytfraktion sicher nachweisen.

9. Die Bestimmung des Harnstoffs durch die Xanthydrolreaktion[2]): Wenn die Harnstoffprobe nach Lüdy in der Barytfraktion positiv ausfällt, so bestimmt man den Harnstoff mit Hilfe der Xanthydrolreaktion. Eine bekannte (möglichst große) Menge Barytfraktion wird mit dem 10- bis 20fachen Volumen Ätheralkohol gefällt, abfiltriert und mit Ätheralkohol nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden bis auf ca. 5 ccm eingedampft. Der Rückstand wird mit 50 ccm einer

[1]) Vgl. Wiechowski-Huppert-Neubauer, Analyse des Harns, XI. Aufl., **1910**, 559.

[2]) R. Fosse, Compt. rend. **145**, 183, 1907, und Hugounenq und Morel, Compt. rend. Soc. Biol. **74**, 1055, 1913.

10%igen alkoholischen Xanthydrollösung[1]) und 50 ccm Eisessig versetzt. Hierbei wird zuerst der feuchte Rückstand — für den Fall zu starken Einengens unter Zusatz von ein paar Tropfen Wasser — in der Mitte des Gefäßes gesammelt. Man setzt sodann etwa 25 ccm Xanthydrollösung zu, filtriert durch ein kleines Filter und wäscht wiederholt mit den übrigen 25 ccm der Lösung nach. Zu den vereinigten Filtraten werden schließlich 50 ccm Eisessig zugesetzt. Man läßt das Gemenge nun bei Zimmertemperatur stehen — nicht weniger als 4, nicht mehr als 15 Stunden. Wenn Harnstoff vorhanden ist, so scheidet sich mit der Zeit ein weißer Niederschlag (Dixanthylharnstoff) aus. Der Niederschlag wird dann auf einem Glaswollfilter (bei 105° gewogen) gesammelt und mit Alkohol 95% (der mit Xanthylharnstoff gesättigt ist) bis zum Verschwinden der sauren Reaktion gewaschen, sodann bei 105° getrocknet und gewogen. Die Gewichtszunahme dividiert durch 7 gibt die Harnstoffmenge:



Xanthydrol + 2 H_2O Dixanthylharnstoff.

10. Beim Kjeldahlisieren des Quecksilberniederschlages und des Quecksilberfiltrates braucht man keinen weiteren Zusatz von Metall als Katalysator. Man nimmt für eine größere Niederschlagsmenge mehr als 10 ccm Kjeldahlsäure. Der mit Quecksilber oxydierte Rückstand darf nicht lange vor seiner Verdünnung mit Wasser stehen bleiben, da sich sonst leicht ein schwer lösliches Mercuriamidosulfat absetzt. Bei der Destillation ist ein Mittel (am bequemsten Zinkpulver) notwendig, um das gebildete Mercuriamidosulfat zu zersetzen[2]).

Schließlich sei hier nochmals betont, daß die Bariumsalze der Oxyproteinsäuren in wasserhaltigem Alkohol sehr leicht löslich sind, ferner daß sich der Harnstoff und andere alkohollöslichen Substanzen nicht leicht vollkommen von der Oxyproteinsäuregruppe trennen lassen, so daß die Alkoholextraktion als das Schwierigste in der ganzen Operationsreihe erscheint. Diese Schwierigkeit wurde aber durch Einführung der Kieselgur erfolgreich überwunden. Außerdem hat unser „Kieselgurverfahren" den Vorteil, daß man, wenn man darauf Wert legt, mit Hilfe der Vakuumdestillation und des Vakuumexsiccators während der ganzen Operation mit einer niedrigen Temperatur auskommen kann.

[1]) Darstellung des Xanthydrols vgl. R. Meyer und E. Saul, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 2, 1276, 1893.

[2]) Näheres vgl. Neubauer-Huppert, Analyse des Harns, XI. Aufl., S. 483 bis 484.

Tabelle I. Operationsfehler bei der neuen Methode und Bemerkungen zur Alkoholextraktion.

Harnnummer und Gesamt-N (g in 1 l Harn)	Versuchsnummer	Baryt-N (g pro 1 l)					Oxyproteinsäure-N (g pro 1 l)				Bemerkungen [Gebrauchte Harnmenge und Extraktionsmethode[2])]
		Roher Baryt-N (gefundene N-Menge in der Barytfraktion)	Harnstoff-N[1])	Echter Baryt-N (roher + Baryt-N — U-N)			Roher Oxyproteins.-N (durch Hg-Acetat + Soda fällbare N-Menge in der Barytfraktion)	Echter Oxyproteins.-N (roher + Oxyproteins.-N — U-N)			
				absolut	Prozente des Baryt-N vom Gesamt-N	Operationsfehler (Verhältnis d. einzelnen Werte zueinander)		absolut	Prozente des Oxyproteins.-N v. Gesamt-N	Operationsfehler	
		g	g	g	%	%	g	g	%	%	
V 12,105	A	0,729	0,0203	0,709	5,86	97,5	—	—	—	—	½ l Harn, A-Methode: Mit 300 ccm Ätheralkohol (abs.) 5 mal gekocht.
	B	0,727	0	0,727	6,02	100,0 (Standard)	—	—	—	—	½ l Harn, A-Methode: Mit 300 ccm Alkohol (abs.) 5 mal gekocht.
VI 12,049	A	0,7397	0,008	0,7317	6,08	100,0 (Standard)	0,5269	0,5189	4,31	100,0 (Standard)	2 l Harn, A-Methode: Mit 400 ccm Ätheralkohol 10 mal gekocht.
	B_1	0,7285	0	0,7285	6,04	99,6	0,5006	0,5006	4,16	96,5	1 l Harn, A-Methode: Mit 300 ccm Ätheralkohol 8 mal gekocht.
	(B_2)	0,6613	0,007	0,6543	5,44	89,4	0,4912	0,4842	4,02	93,3	1 l Harn, B-Methode: 20 Std. im Soxhlet, dann im Kolben 2 mal mit Alkohol 95% gekocht.
	C	0,7896	0,0583	0,7313	6,07	100,0	0,5768	0,5251	4,36	101,2	1 l Harn, B-Methode: 20 Std. im Soxhlet, dann neuerlich zerrieben, noch 7 Std. extrahiert.
	D	0,8013	0,0667	0,7346	6,10	100,4	0,5997	0,5330	4,42	102,7	1 l Harn, B-Methode: 16½ Std. im Soxhlet, dann zerrieben und noch 5 Std. extrahiert.
VII 9,912		0,571	unwägbar	0,571	5,77	—	0,449	0,449	4,53	—	1 l Harn. B-Methode: 20 Std. neuerlich zerrieben, noch 10½ Std. im Soxhlet, endlich m. abs. Alkohol im Kolben gekocht!
VIII 11,088	A	0,7252	0,0275	0,6977	6,29	100,0 (Standard)	0,553	0,526	4,74	100,0 (Standard)	1 l Harn, B-Methode: 20½ Std. neuerlich zerrieben, dann 12 Std. extrahiert.
	B	0,721	0,050	0,671	6,05	96,2	0,567	0,517	4,66	98,3	200 ccm Harn, A-Methode: Mit 150 ccm Ätheralkohol (abs.) 5 mal gekocht.
	C_1	0,640	unwägbar	0,640	5,77	91,7	0,515	0,515	4,65	97,9	200 ccm Harn, A-Methode: Mit 150 ccm Ätheralkohol 6 mal gekocht.
	C_2	0,630	0	0,630	5,68	90,3	0,494	0,494	4,46	93,9	200 ccm Harn, B-Methode: Mit 200 ccm Ätheralkohol 5 mal gekocht.
	C_3	0,609	0	0,609	5,49	87,3	0,476	0,476	4,29	90,5	200 ccm Harn, B-Methode: Mit 200 ccm Ätheralkohol 5 mal gekocht!

[1]) Harnstoff ist mit Quecksilber + Soda quantitativ fällbar (Hupper-Neubauer = Analyse des Harns. XI. Aufl. S. 544).

[2]) Ätheralkohol (abs.) = Mischung von Äther 1 + abs. Alkohol 2. Ätheralkohol = Mischung von Äther 1 + Alkohol 95% 2.

Tabelle II.

Verluste an Ausbeute bei Anwendung von wasserhaltigem Alkohol und Umgehen der Vorbehandlung mit Schwefelsäure und Alkohol.

Versuchsnummer (normaler Harn VIII mit Gesamt-N 11,08 g pro 1 l)	Methodische Bemerkungen				Ausbeute (pro 1 l Harn)				Bemerkungen
	Gebrauchte Harnmenge ccm	Vorbehandlung mit H_2SO_4 und Alkohol	Extraktionsmethode	Extraktionsmittel	Baryt-N g	Oxyproteins.-N g	Rest-N g	Ausbeute an Oxyproteins.-N	
A	1000	vorschriftsmäßig ausgeführt	B-Methode	absoluter Alkohol (99,7 %)	0,698	0,526	0,160	100,0 (Standard)	
B	200	do.	A-Methode	Äther 1 + abs. Alkohol 2	0,671	0,517	0,162	98,3	
C_{1-3}	200	do.	A-Methode	Äther 1 + Alkohol 95 % 2	0,626	0,495	0,109	94,1	Durchschnittswerte dreier Bestimmungen (s. o.)
D	1000	do.	B-Methode	95 %iger Alkohol mit $CuSO_4$ entwässert	0,4060	0,3570	0,0496	69,5	
E	500	do.	B-Methode	do.	0,3643	0,3164	0,0448	60,2	
F	500	ohne Vorbehandlung	B-Methode	do.	0,0476 (0,1736)	0,0356 (0,1428)	0,0140 (0,0224)	6,8 (27,2)	
G	200	do.	A-Methode	absoluter Alkohol + Äther	0,2415	0,1616	0,0725	30,6	

Die Differenzen zwischen der Baryt-N-Menge einerseits und der Summe von Oxyproteinsäure-N- und Rest-N-Menge sind auf die Operationsfehler (beim Kjeldahlisieren) zurückzuführen.

Die Zahlen in Klammern bei Versuch F stellen die Baryt-N-Menge usw. dar, die aus der ersten Extraktionsflüssigkeit (Alkohol) durch die vorschriftsmäßige Bestimmung gewonnen wurde.

Die Tabelle I erläutert, wie lange man die Kieselgur (von oxyproteinsaurem Barium durchtränkt) aus einer kleineren Menge (200 ccm) bezw. aus einer größeren Menge (1 bis 2 Liter) Harn mit Alkohol (durch die A- oder B-Methode) extrahieren muß, um sie harnstofffrei zu machen. Ferner ersieht man, daß die neue Methode aus einem und demselben Harne ganz übereinstimmende Resultate liefert. Endlich zeigt die Tabelle, daß der Gebrauch von Alkohol 95 % im Verein mit Äther als Extraktionsflüssigkeit bei einer größeren Menge Harn (1 Liter) keinen

Verlust an Ausbeute mit sich bringt, dagegen bei einer kleineren Menge Harn (200 ccm) immerhin einen merklichen Verlust (2 bis 10 %) nach sich ziehen kann (siehe den Versuch VIII c).

Die Tabelle II bringt die Resultate der Versuche, die einen Überblick über die Verluste bei Anwendung von wasserhaltigem Alkohol und Umgehung der Vorbehandlung mit Schwefelsäure und Alkohol liefern.

3. Die Beschaffenheit der erhaltenen Barytfraktion.

Für die Brauchbarkeit unserer neuen Methode war es von großer Wichtigkeit, festzustellen, ob unsere Barytfraktion (wässerige Lösung der Bariumsalze der Oxyproteinsäuren) tatsächlich oder wenigstens praktisch von anderen stickstoffhaltigen Harnbestandteilen frei sei. Wir haben deshalb auf alle wichtigen N-haltigen Harnbestandteile, die in der Barytfraktion vorkommen könnten, Rücksicht genommen.

Von vornherein scheint aber eine Beimengung von Harnsäure und Hippursäure in der Barytfraktion unwahrscheinlich, denn die erstere geht mit Baryt Verbindungen zu wasserunlöslichen Bariumsalzen ein, und die letztere ist in Form von Erdkalisalzen alkohollöslich. In der Tat war auch die Murexidprobe der Harnsäure in der Barytfraktion negativ. Ebenso fiel auch die Kreatininprobe nach Jaffé in der Regel negativ aus, während sich Kreatin (Jaffésche Reaktion nach vorausgegangener Hydrolyse) häufig in unmeßbaren Spuren nachweisen ließ.

Von größter Wichtigkeit schien es uns aber, die Abwesenheit von Harnstoff, Ammoniak und Aminosäuren in der Barytfraktion sicherzustellen. Zu diesem Zwecke stellten wir aus 1 bis 2 Liter normalen Harnes vorschriftsmäßig die Barytfraktion her und bestimmten in dieser die genannten Bestandteile quantitativ und zwar den Harnstoff mit Hilfe des Xanthydrolverfahrens, den Ammoniak nach Folin und den Amino-N nach van Slyke.

Es hat sich nun herausgestellt, wie aus der Tabelle III zu entnehmen ist, daß der Harnstoff-N in der Barytfraktion in oft wechselnder — immer sehr geringer — Menge vorhanden war. Diese Beimengung ist aber nach einer vorsichtigen Alkoholextraktion — selbst bei der Operation mit einer großen Menge (1 bis 2 Liter) Harns — immer so klein, daß man sie nicht in Rechnung zu ziehen braucht (1 bis 4 % des Gesamt-N der Barytfraktion war in Form von Harnstoff-N vorhanden).

Tabelle III.

Harn-nummer	Beschaffenheit der Barytfraktion: g pro einen Liter Harn: Gesamt-N	Baryt-N	Oxyproteins.-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Amino-N	Harnsäure	Kreatinin	Kreatin	Baryt-N = 100 %: Oxyproteins.-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Amino-N
V	12,105	0,729	—	0,0203	0,0240	(0,048)	(—)	(—)	(—)	—	2,79	3,30	(6,60)
VI A	12,049	0,7397	0,519	0,0080	0,0280	(0,0317)	(—)	(—)	(+) unmeßbar	70,2	1,08	3,78	(4,28)
VII B_2	12,049	0,6613	0,484	0,0070	0,0190	—	(—)	(+) unmeßbar	(+) unmeßbar	73,1	1,06	2,88	—
VIII	11,088	0,7252	0,553	0,0275	0,0126	0 (0,0425)	(—)	(±)	(+) unmeßbar	76,2	3,80	1,74	0 (5,86)

Die Zahlen des Amino-N in Klammern bedeuten die nach van Slyke in 10 Minuten bestimmte N-Menge (ohne Korrektur für den Harnstoff-, NH_3- und Oxyproteinsäure-N).

Es hat sich weiter gezeigt, daß eine sehr geringe Menge Ammoniak immer in der Barytfraktion bestimmbar war. Das im Harn präformierte Ammoniak wird offenbar beim Eindampfen des mit Baryt und Kohlensäure gefällten Harns (also bei bariumkarbonatalkalischer Reaktion) vollständig entfernt. Es muß daher während der Operation aus anderen Körpern, höchstwahrscheinlich aus den Oxyproteinsäuren selbst, entstanden sein. Es scheint sogar die Annahme berechtigt zu sein, daß das Ammoniak teilweise erst bei der Bestimmung desselben durch Spaltung der Oxyproteinsäuren entsteht[1]). Jedenfalls ist seine Menge so gering (2 bis 4 % des Baryt-N), daß man sich eine weitere Berücksichtigung ersparen kann.

Was den nach van Slyke ermittelten N (Amino-N) in der Barytfraktion betrifft, den ich in 10 Minuten unter starkem Schütteln sammelte, beträgt derselbe einige Zentigramm in der aus 1 Liter Harn gewonnenen Barytfraktion (4 bis 6 % des Baryt-N). Er stammt aber nicht aus den wirklich beigemengten Aminosäuren, sondern aus dem etwa anwesenden Harnstoff, aus Ammoniak und sicher auch aus den Oxyproteinsäuren. Diese

[1]) Nach Browinski und Dombrowski (Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 92) enthalten das Urochrom und die Alloxyproteinsäure 2,7 bzw. 2,9 % ihres N in einer bereits durch Kochen mit Magnesia als Ammoniak abspaltbaren Form.

Behauptung erscheint durch folgende Beobachtungen begründet.

Ich habe nämlich in der Absicht, für den vorhandenen Harnstoff- und Ammoniak-N eine Korrektur auszuführen, nachstehende Versuche vorgenommen:

Aus einem Liter normalen Harns (VIII) wurden 200 ccm Barytfraktion gewonnen. Aus 10 ccm davon entwickelten sich bei der Bestimmung des Amino-N nach van Slyke

bei Versuch 1 in den ersten 10 Minuten 4,5 ccm = 2,3 mg N
in den zweiten 10 Minuten 4,5 ccm = 2,3 mg N
in den dritten 10 Minuten 2,4 ccm = 1,3 mg N

bei Versuch 2 in den ersten 10 Minuten 4,3 ccm = 2,3 mg N
in den zweiten 10 Minuten 5,0 ccm = 2,7 mg N
in den dritten 10 Minuten 2,7 ccm = 1,5 mg N

Es kam demnach in den ersten 10 Minuten nicht mehr N als in den zweiten zum Vorschein, woraus schon ersichtlich ist, daß dieser N keinen echten Amino-N darstellt, d. h. daß in dieser Barytfraktion keine freie Aminosäuren vorhanden sind. Denn der N der aliphatischen Aminosäuren wird in 4 bis 5 Minuten durch die Wirkung von salpetriger Säure unter den gegebenen Bedingungen quantitativ abgespalten, während diese Spaltung bei Harnstoff und Ammoniak langsam und ziemlich gleichmäßig vor sich geht[1]).

Andererseits enthielten 10 ccm dieser Barytfraktion nur 1,4 mg Harnstoff-N und 0,6 mg Ammoniak-N (vgl. Tabelle), während sich 2,3 mg N (also mehr als die Summe des Harnstoff- und Ammoniak-N) unter Einwirkung von salpetriger Säure in 10 Minuten und in den nächsten 10 Minuten wieder ebenso viel N entwickelten. Der Überschuß von N dürfte also nicht von Harnstoff und Ammoniak, sondern von den Oxyproteinsäuren herstammen. Denn in unserer Barytfraktion ist kein anderer Körper vorhanden, aus dem so viel N herstammen könnte.

Dieser Befund entkräftet, wie ich glaube, endgültig den von Erben gegen Ginsberg erhobenen Vorwurf, „dieser habe Aminosäuren mitbestimmt", und läßt gleichzeitig die Angaben Browinskis und Dombrowskis[2]) sowie Glagolews[3]), daß die Oxyproteinsäuren vor der Hydrolyse große Mengen Amino-N enthalten, zweifelhaft erscheinen.

---

[1]) Vgl. van Slyke, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **43**, 3170, ferner derselbe u. a. — Journ. of Biolog. Chem. **12**, 275 u. 399, 1912.

[2]) Nach Browinski nnd Dombrowski (l. c.) beträgt der N der Aminosäuren (durch Formoltitration) vor der Hydrolyse im Urochrom 2,4, in der Alloxyproteinsäure 7,5, in der Oxyproteinsäure 11,3 und in der Antoxyproteinsäure 33,8 % des Gesamt-N.

[3]) Nach P. Glagolew (Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 432, 1914) enthält vor der Hydrolyse alloxyproteinsaures Barium 20,5 %, oxyproteinsaures Barium 44,3 % vom Gesamt-N in der Form von NH_3 (nach van Slyke).

Schließlich möchte ich auch auf die Tatsache hinweisen, daß der N bei der Bestimmung nach van Slyke, auch nach Ablauf der Zeit von 5 bis 10 Minuten sich noch immer weiter aus der Barytfraktion entwickelt, bis er sich beim Stehenlassen des Apparates bis zum nächsten Tag oft zu einem großen Volumen vermehrt.

Aus dem Dargelegten geht hervor, daß die nach unserer neuen Methode gewonnene Barytfraktion keine in Betracht kommende Menge von Harnstoff und Ammoniak und anscheinend keine Aminosäuren enthält und sonach der gesamte N in jener praktisch als echter Baryt-N betrachtet werden kann. Nur bei Forderung eines sehr genauen Resultates empfiehlt es sich, eine Probe auf Harnstoff nach Lüdy oder mit der Xanthydrolreaktion anzustellen und denselben eventuell nach der letzteren quantitativ zu bestimmen.

Einige weitere Eigenschaften der Barytfraktion.

Weiter wurden an der Barytfraktion einige Eigenschaften derselben studiert, und zwar die Fällbarkeit des Baryt-N mit Quecksilber und Soda (Oxyproteinsäure-N), mit Phosphorwolframsäure in salzsaurer Reaktion (P.W.S.N.) und mit Bleiessig unter Vermeidung eines Überschusses an Reagenz (Bleiessig-N = Alloxyproteinsäure-N), ferner die Hydrolysierbarkeit des Baryt-N durch langes Kochen mit Säure oder Alkali (Polypeptid-N).

1. Oxyproteinsäure-N. Über die Fällbarkeit des Baryt-N mit Quecksilberacetat in sodaalkalischer Reaktion weichen die Angaben der beiden folgenden Autoren voneinander ab: Während Gawinski sämtlichen N in seinem „Barytsirup" (d. h. Baryt-N) mit Quecksilber und Soda fällbar fand, gelang dies Ginsberg nicht vollkommen. Der letztere nannte diesen mit Quecksilber nicht fällbaren Anteil des Baryt-N „Rest-N" und räumte ihm eine besondere chemische Stellung ein. Ich habe auch in meiner Barytfraktion nur 70 bis 80 % des Baryt-N fällbar gefunden (vgl. Tabellen) und muß daher die Angabe Gawinskis bestreiten.

2. Phosphorwolframsäure-N, d. h. der durch Phosphorwolframsäure bei mineralsaurer Reaktion fällbare Baryt-N betrug bei verdünnter Barytfraktion 9 bis 10 %[1]. Dagegen war aus konzentrierter Barytfraktion ca. $^1/_4$ des Baryt-N durch Phosphorwolframsäure fällbar[2].

[1]) Das Urochrom ist durch Phosphorwolframsäure fällbar. Vgl. Gawinski, l. c.

[2]) Die Antoxyproteinsäure wird aus konzentrierter Lösung gefällt. Der Niederschlag ist jedoch sowohl im Überschuß des Fällungsmittels wie auch in Wasser leicht löslich. Vgl. Bondzynski, Dombrowski und Panek, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 83, 1905.

3. Bleiessig-N, d. h. der durch Bleiessig unter Vermeidung eines Überschusses fällbare Baryt-N (= Alloxyproteinsäure-N) betrug einmal 21,5, ein andermal 22,2% bei einem normalen Harne.

4. Polypeptid-N, d. h. der durch Säure- und Alkaliwirkung hydrolysierbare Baryt-N schwankte zwischen 24 und 34%. Hier wurde der N, der sich aus der hydrolysierten Barytfraktion bei der Bestimmung nach van Slyke in 10 Minuten entwickelte, kurzweg als Polypeptid-N bezeichnet[1]). Die Säurehydrolyse (3stündiges Kochen der Barytfraktion mit 20%iger Salzsäure) und die Alkalihydrolyse (4stündiges Kochen mit gesättigter Barytlösung unter 4 Atmosphären Druck) erwiesen sich in ihrer Leistung als gleichwertig[2]).

Tabelle IV.

Einige Eigenschaften der Barytfraktion

Harn-nummer	g pro 1 l Harn						Baryt-N = 100%			
	Gesamt-N	Baryt-N	Oxyprot-eins.-N	P.W.S.-N	Bleiessig-N	Poly-peptid-N	Oxyprot-eins.-N	P.W.S.-N	Bleiessig-N	Poly-peptid-N
V	12,105	0,729	—	—	—	0,250 (Säure)	—	—	—	34,3
VI A	12,049	0,7397	0,519	0,0677 (0,221)	0,159	0,219 (Säure)	70,2	9,17 (29,2)	21,5	29,7
VI B_1	12,049	0,729	0,501	0,0714	—	0,175 (Säure) 0,189 (Alkali)	68,9	9,80	—	24,1 26,0
VI B_2	12,049	0,6613	0,484	(0,162)	0,1468	—	73,1	(24,5)	22,2	—
VIII	11,088	0,7252	0,553	—	—	0,196 (Säure) 0,187 (Alkali)	76,2	—	—	27,1 25,8

Die Zahlen des P.W.S.-N. (Phosphorwolframsäure-N) in Klammern sind die aus konzentrierter Barytfraktion durch Phosphorwolframsäure fällbaren N-Mengen.

Die Zahlen des Polypeptid-N mit Bemerkung „Säure" bedeuten die durch HCl hydrolisierte N-Menge; die Zahlen mit „Alkali" ebenso die durch Baryt hydrolysierte.

---

[1]) Für die Anwesenheit von NH_3 in der hydrolysierten Barytfraktion lieferte der Umstand den Beweis, daß die Entwicklung des meßbaren N nach Abschluß des van Slykeschen Verfahrens noch immer fortdauerte.

[2]) Über den Gehalt des Aminosäuren-N in einzelnen Oxyproteinsäuren nach vorhergegangener Hydrolyse vgl. die Arbeiten von Browinski und Dombrowski (l. c.) und von Glagolew (l. c.).

4. Kritik der bisherigen Methoden.

Bei der Ausarbeitung unserer neuen Methode zur quantitativen Bestimmung der gesamten Oxyproteinsäurefraktion war es von besonderer Wichtigkeit, die Ursachen des großen Unterschiedes zwischen den Oxyproteinsäurewerten Ginsbergs und Gawinskis einerseits und denjenigen von Salomon und Saxl andrerseits festzustellen. Zu diesem Zwecke haben wir zuerst die älteren Methoden unter strenger Festhaltung an den gegebenen Vorschriften kritisch nachgeprüft. Die dabei gemachten Erfahrungen sollen kurz wiedergegeben werden.

1. Methode von Gawinski. Gawinski hat sich ein großes Verdienst dadurch erworben, daß er die Vorbehandlung des Harnsirups mit H_2SO_4 und Alkohol in seine Methode eingeführt hat. Bei Überprüfung seines Verfahrens stößt man leider im Detail auf schwer zu umgehende Schwierigkeiten, besonders da, wo man aus dem mit Ätheralkohol extrahierten schmierigen Rückstand des Harns resp. aus dessen wässeriger Lösung unter Zusatz von Sand ein für die Soxhletsche Extraktion geeignetes Pulver herstellen will. Dazu ist eine hohe Tempeperatur (etwas über 100°) nötig, um nämlich die auf dem Wasserbade bis zu einer klebrigen Konsistenz eingeengte Masse weiter bis zur Trockne zu bringen; sonst erreicht man — selbst in mehreren Tagen — keine Pulverisierbarkeit. Bei so hoher Temperatur zersetzen sich aber sicherlich die unreinen Oxyproteinsäuren, worauf auch die schmutzige Färbung der so erhaltenen Barytfraktion hinweist. Auch liegt ja ein großer Widerspruch darin, daß man nach der Vorschrift Gawinskis anfangs Vakuumdestillation (55°) und später hohe Hitzegrade anwendet. Ferner kann man die getrocknete Masse nie quantitativ aus dem Mörser in die Soxhlethülse bringen, da diese Masse während des Zerreibens leicht zerfließt und teilweise am Gefäße fest anklebt. Außerdem war es mir unmöglich, die so pulverisierte, aber teilweise während der Operation durch Wasseranziehung ziemlich klumpig gewordene Masse durch eine kurzdauernde (3 bis 5stündige) Alkoholextraktion vollkommen harnstofffrei zu machen. Endlich gelang mir die Fällung des N im so gewonnenen „Barytsirup“ mit Quecksilberacetat und Soda nie quantitativ.

2. Methode von Salomon und Saxl. Bei der Nachprüfung der Salomon-Saxlschen Methode ergab sich zunächst, daß die Autoren bei der Fällung unnötig viel Barytlösung (3 bis 5mal mehr als nötig) gebraucht haben. Ferner hat es sich gezeigt, daß das zweite Durchleiten von Kohlensäure, um den Barytüberschuß zu entfernen, ganz überflüssig ist, vorausgesetzt, daß das Durchleiten beim ersten Male gründlich geschah. Es war mir auch nicht jedesmal möglich, die bis auf 50 g eingeengte Barytfraktion samt 10 ccm Waschwasser — ich habe sie immer in einer gewogenen Schale bis auf 50 g eingedampft — durch Alkoholäther flockig auszufällen. Aus konzentriertem Harn (mit einem Gesamt-N von über 1%) bekommt man unter der angegebenen Bedingung nicht die verlangte Ausscheidungsform, sondern oft anfangs flockige Niederschläge, die aber trotz des häufigen Durchschüttelns allmählich zu gröberen Klumpen sich vereinigen und endlich an den Gefäßwänden mehr oder minder fest anhaften, so daß man sie nochmals in Wasser lösen und wieder mit Ätheralkohol ausfällen muß; oder aber man darf von vornherein nicht bis auf 50 g einengen.

Was uns aber besonders interessierte, war die Aufdeckung der Ursachen, warum das Salomon-Saxlsche Verfahren eine um so vieles geringere Ausbeute liefert.

Zuerst ging ich daran, die Löslichkeit der reinen Bariumsalze der Oxyproteinsäuren in Ätheralkohol in der von Salomon und Saxl gegebenen Verdünnung festzustellen.

Zu diesem Zwecke wurde eine konzentrierte (200 ccm Harn entsprechende) Barytfraktion mit bekanntem Baryt-N-Gehalt (Harn VI A) mit Wasser zu 50 ccm verdünnt und hierauf mit 1000 ccm Ätheralkohol gefällt. Nach 24 Stunden wurde der N-Gehalt im Niederschlag und im Filtrate (Ätheralkohol) bestimmt.

N-Gehalt in der gebrauchten Barytfraktion . = 0,1479 (100%)
„ im Niederschlag . . . . . = 0,1012 (68,3%)
„ im Filtrate . . . . . = 0,0424 (28,7%)

Unter der obigen Bedingung blieb also 29% des Baryt-N in Lösung und es ist naheliegend anzunehmen, daß die oxyproteinsauren Salze in unreinem Zustande noch leichter löslich sein dürften[1]).

Eine der Fehlerquellen bei Salomon und Saxl ist demnach auf die Anwendung einer zu großen Menge der zu fällenden wässerigen Flüssigkeit zurückzuführen.

[1]) Vgl. Ginsberg, l. c., S. 417.

Tabelle

Versuche zum Vergleich der neuen

Harn-nummer	Angewandte Methode und methodische Bemerkungen	Aus- Gefundene Werte pro 1 l Harn		
		Baryt-N g	Oxy-protein-säure-N g	Rest-N g
VII: Normaler Harn mit Gesamt-N 9,912 g in 1 l	Neue Methode	0,5712	0,4491	0,1197
	Methode nach Salomon-Saxl 1	0,1669	0,1476	0,0152
	" " " 2	0,1706	0,1456	0,0320
	Das eingeengte Filtrat (1+2) nach Salomon-Saxl wurde ohne Vorbehandlung mit H_2SO_4 + Alkohol mit Kieselgur pulverisiert, extrahiert usw.	0,020	0,016	0,009
	Nach S. u. S.[1]): Der Harn wurde vor der Barytfällung mit H_2SO_4 angesäuert, sonst vorschriftsmäßig	0,1792	0,1493	—
VIII: Normaler Harn mit Gesamt-N 11,088 g in 1 l	Neue Methode	0,698	0,526	0,160
	Nach S. u. S. 1	0,186	0,154	0,035
	Nach S. u. S. 2	0,1512	0,1092	0,0476
	Das Filtrat nach S. u. S. 2, ohne Vorbehandlung mit H_2SO_4 + Alkohol, s. o.	0,0319	—	—
	Nach S. u. S. 3	0,2030	0,1404	0,0580
	Das Filtrat nach S. u. S. 3 wurde vorschriftsmäßig nach d. neuen Methode bestimmt	0,3689	0,3066	0,0588
	Nach S. u. S. mit H_2SO_4, s. o.	0,1400	0,1221	0,0213
Carcinom IV mit Gesamt-N 10,36 g in 1 l	Neue Methode	0,7245	0,5740	0,1435
	Nach S. u. S.	0,2404	0,203	0,035
	Das Filtrat nach S. u. S. durch die neue Methode bestimmt	0,4901	0,376	0,111
Carcinom V mit Gesamt-N 14,084 g in 1 l	Neue Methode	1,050	0,8435	0,2245
	Nach S. u. S.	0,4176	0,3395	0,070
	Das Filtrat nach S. u. S. mit H_2SO_4 + Alkohol behandelt, sonst nach der S. u. S.schen Vorschrift bestimmt	0,374	0,284	0,104
Tuberkulose II: Gesamt-N 16,128 g in 1 l	Nach S. u. S.	0,399	0,3542	0,0448
	Das Filtrat nach S. u. S. wurde durch die neue Methode bestimmt	0,8316	0,6538	0,186
	Summe dieser zwei Bestimmungen	—	1,008	—

[1]) S. u. S. = Salomon und Saxl.

V.

Methode mit der Salomon-Saxlschen.

beute					
Verhältnisse zum Gesamt-N			Zum Vergleich:	$\frac{\text{Oxyproteinsäure-N}}{\text{Baryt-N}} \times 100$	Sonstige Bemerkungen
Baryt-N %	Oxyprotein-säure-N %	Rest-N %	Ausbeute an Oxyprotein-säure-N %	%	
5,77	4,53	1,19	100 (Standard)	78,5	
1,68	1,49	0,15	33,0	88,4	
1,72	1,47	0,32	32,5	85,5	
—	—	—	3,6	—	
1,81	1,50	—	33,3	83,3	
6,29	4,74	1,44	100 (Standard)	75,3	
1,67	1,38	0,31	29,3	82,9	
1,36	0,98	0,43	20,7	72,2	
0,29	—	—	—	—	
1,83	1,26	0,52	26,7	69,1	
3,32	2,76	0,53	58,4	83,2	Barytfraktion war frei von $\overset{+}{U}$
1,26	1,10	0,19	23,2	87,2	
6,98	5,52	1,38	100 (Standard)	79,2	
2,31	1,96	0,34	35,4	84,4	
4,72	3,62	1,07	65,3	76,7	Barytfraktion war frei von $\overset{+}{U}$
7,47	6,0	1,60	100 (Standard)	80,5	
2,96	2,41	0,50	40,2	81,2	
2,65	2,02	0,74	33,7	76,0	
2,48	2,20	0,28	35,0	88,8	
5,17	4,07	1,15	65,0	78,7	
—	6,27	—	100 (Standard)	—	

Bei sämtlichen Versuchen wurden der Baryt-, Oxyproteinsäure- und Rest-N einzeln bestimmt. Die Differenzen zwischen der Baryt-N-Menge und der Summe von Oxyproteinsäure- und Rest-N-Menge sind auf Operationsfehler zurückzuführen.

Wenn aber diese Verdünnung des Ätheralkohols mit einer zu großen Flüssigkeitsmenge der Barytfraktion die alleinige Fehlerquelle wäre, so müßte ich den größten Teil des Verlustes wieder einbringen, wenn ich das nach Salomon-Saxl erhaltene Filtrat bis zum Sirup einenge, einfach mit Kieselgur pulverisiere, mit absolutem Alkohol von Harnstoff und anderen Beimengungen befreie und nun im Rückstand den N bestimme. Aber dies gelang mir niemals, und in der so gewonnenen Barytfraktion war nur ein kleiner Bruchteil der gesuchten Oxyproteinsäuren bestimmbar (vgl. VII und VIII in der Tabelle V). Ähnliche Versuche sind auch von Salomon und Saxl zum Beweise dafür angeführt worden, daß in ihrem Filtrat keine Oxyproteinsäuren verloren gegangen wären.

Wohl aber gelingt es im Salomon-Saxlschen Filtrat, die ganze verlorengegangene Menge von Oxyproteinsäuren nachzuweisen, wenn man dasselbe nach Vertreibung des Ätheralkohols mit Schwefelsäure ansäuert, hinterher mit Alkohol die Alkalisalze beseitigt, das Filtrat mit Baryt behandelt und die Operation dann weiter nach unserem Verfahren zu Ende führt.

Fragen wir uns nunmehr, welches die wesentlichen Fehlerquellen des Salomon und Saxlschen Verfahrens sein dürften, so glaube ich, daß dafür folgende drei Momente in Betracht kommen:

1. die Fällung mit Ätheralkohol aus allzu verdünnter Lösung;

2. die Unterlassung des Schwefelsäurezusatzes vor Beginn der Prozedur derart, daß nach Barytzusatz nicht alle Oxyproteinsäuren in Form der alkoholunlöslichen Barytsalze vorhanden waren, ein Teil vielmehr in Form der in Alkohol leicht löslichen Alkalisalze der Fällung entgangen ist;

3. die Unterlassung der Beseitigung der anorganischen Sulfate nach Zusatz von Schwefelsäure durch Alkohol zu Beginn der Prozedur.

Was das erste Moment betrifft, kann dasselbe allein, wie gesagt, nicht von ausschlaggebender Bedeutung sein; sonst müßte es ja gelingen, aus dem Filtrate nach starker Einengung den Rest der Oxyproteinsäuren wieder zu gewinnen, was, wie wir gesehen haben, nicht der Fall ist.

Auch das zweite Moment dürfte nicht allein von dominierender Bedeutung sein, denn ich habe mich überzeugt, daß, wenn man zu Anfang des Versuchs alle Oxyproteinsäuren durch Schwefelsäurezusatz in Freiheit setzt und nach Salomon und Saxl weiter arbeitet, die Resultate nicht besser werden (vgl. Versuche nach Salomon und Saxl mit H_2SO_4).

Von größter Bedeutung dagegen scheint die schon von Bondzynski und Gottlieb empfohlene Vorbehandlung des Harns mit Schwefelsäure und Alkohol und die Beseitigung der in großen Mengen sich abscheidenden anorganischen Alkalisalze zu sein. Ich habe mich davon überzeugt, daß, wenn man diese scheinbar nebensächliche Prozedur umgeht, sich bei der späteren Extraktion der Kieselgurmasse mit Alkohol dieser immer anfangs sehr stark färbt. Es ist festgestellt, daß dabei große Mengen von Oxyproteinsäuren verloren gehen (vgl. Versuche VII und VIII, außerdem Versuch F in der Tabelle II).

Es ist bei einiger Überlegung auch leicht verständlich, warum dies der Fall sein muß.

Wenn man den Harn mit Schwefelsäure angesäuert hat, findet sich in demselben neben den freien Oxyproteinsäuren eine gewisse Menge von schwefelsaurem Alkali. Wenn man es nun unterläßt, die schwefelsauren Alkalisalze, die in Alkohol sehr schwer löslich sind, durch Alkoholfällung zu beseitigen und nunmehr einen Überschuß von Barytwasser hinzufügt, so wird man allerdings zunächst selbstverständlich die freien Oxyproteinsäuren in ihre Barytsalze verwandelt haben. Gleichzeitig aber wird die Schwefelsäure der Alkalisulfate quantitativ als Bariumsulfat ausfallen und die entsprechende Menge von Alkali wird in Form von Hydroxyd gelöst bleiben und sich nach Beseitigung des Barytüberschusses mit Kohlensäure als Alkalicarbonat vorfinden. Nun ist aber in der Lösung Gelegenheit zu einem Umsatz von oxyproteinsaurem Barium mit Alkalicarbonat zu oxyproteinsaurem Alkali und Bariumcarbonat gegeben. Der erwünschte Effekt, alle Oxyproteinsäuren in ihre Barytsalze überzuführen, wird also durch die Behandlung mit Schwefelsäure und Baryt allein nicht erzielt werden, wenn man es unterlassen hat, nach Schwefelsäurezusatz durch Alkohol die Alkalisulfate möglichst vollständig zu beseitigen.

Wenn Ginsberg trotz Außerachtlassung dieser wichtigen Fehlerquelle doch im wesentlichen richtige Resultate erzielt hat, so verdankt er dies dem Umstande, daß er aus sehr konzentrierter Lösung gefällt hat und auch die Alkalisalze der Oxyproteinsäuren in wasserarmem, kaltem Ätheralkohol offenbar sehr wenig löslich sind.

Anders dagegen Salomon und Saxl, die eine wasserreiche Lösung mit Ätheralkohol gefällt hatten. Im stark wasserhaltigen Ätheralkohol waren die Alkalisalze der Oxyproteinsäuren eben in Lösung geblieben. Und auch, wenn man das Filtrat hinterher zum Sirup eingeengt, mit Kieselgur pulverisiert und mit heißem absolutem Alkohol von Harnstoff befreit hat, konnte man die Oxyproteinsäuren unmöglich wiederfinden (s. o.); waren doch die in Alkohol leicht löslichen Alkalisalze der Oxyproteinsäuren eben gemeinsam mit dem Harnstoff in Lösung gegangen.

Die Feststellung, ob Salomon und Saxl nach ihrer Methode einen willkürlichen Teil der gesamten Oxyproteinsäuren oder eine besondere — schwerer lösliche — Fraktion dieser Gruppe bestimmt haben, bedarf einer speziellen Untersuchung. Folgendes sei hier nur bemerkt: Obwohl der Oxyproteinsäure-N im Niederschlag und der im Filtrat nach Salomon-Saxl sich in der Regel wie 1:2 verhalten, so unterscheidet sich doch die aus dem Niederschlag erhaltene Barytfraktion von der aus dem Filtrat gewonnenen dadurch, daß in der ersten mehr gefärbte Oxyproteinsäure (Urochrom) vorhanden ist und der N durch Quecksilber und Soda besser fällbar ist als in der letzteren (vgl. Tabelle).

Schließlich ist zu beachten, daß das Salomon-Saxlsche Verfahren bei Doppelanalysen aus einem und demselben Harn oft eine beträchtlich schwankende Ausbeute gibt. Dies geht sicherlich darauf zurück, daß dieses Verfahren nur eine Fraktion der Oxyproteinsäuren zu gewinnen gestattet und schon eine geringe Verschiebung der Bedingungen eine große Schwankung in der Menge der fällbaren Substanzen verursacht (vgl. u. a. den Versuch mit Harn VIII).

3. Methode nach Erben. Was die Erbensche Methode betrifft, so ist ihr Fraktionierungsprinzip (das Fällen der Barytfraktion mit Quecksilberacetat in schwach essigsaurer Reaktion) um so willkürlicher, als die fällbaren Substanzen in überschüssiger Essigsäure leicht gelöst bleiben. Außerdem hat solch ein fraktioniertes Bestimmungsverfahren angesichts der noch herrschenden Unkenntnis über die Bedeutung und Einheitlichkeit der einzelnen Fraktionen der Oxyproteinsäuregruppe nur einen bedingten Wert.

Tabelle VI.

Harnnummer	Ernährungszustand	Oxyproteinsäure-N-Gehalt im normalen und pathologischen Harn							Bemerkungen
		Gramm in einem Liter				Verhältnis zum Gesamt-N (%)			
		Gesamt-N	Baryt-N	Oxyproteins.-N	Rest-N	Baryt-N	Oxyproteins.-N	Rest-N	
Normal V	—	12,105	0,709	—	—	5,86	—	—	
„ VI	—	12,049	0,732	0,520	0,212	6,08	4,32	1,76	Durchschnittswerte der 4 Bestimmungen (s. o.).
„ VII	—	9,912	0,571	0,449	0,120	5,77	4,53	1,19	
„ VIII	—	11,088	0,698	0,526	0,160	6,29	4,74	1,44	
Morbus Recklinghausen	befriedigend	6,686	0,4760	0,3976	0,0711	7,13	5,95	1,06	Tägl. Harnmenge ca. 1000 ccm.
Krebs:									
Magenkrebs 1	keine Kachexie, keine Anämie	5,230	0,1946	0,1638	0,0390	3,74	3,14	0,75	
„ 2	keine Kachexie	11,099	0,5729	0,4592	0,1064	5,16	4,14	0,96	
„ 3	Kachexie	6,552	0,3701	0,2902	0,0686	5,65	4,44	1,04	
„ 4	hochgradige sekundäre Anämie, geringe Kachexie	10,360	0,7245 (0,2404)	0,5740 (0,2030)	0,1435 (0,0350)	6,98 (2,31)	5,52 (1,96)	1,38 (0,34)	
Ösophaguskrebs (Obd.-Diagn.)	starke Kachexie	14,084	1,050 (0,4179)	0,8435 (0,3395)	0,2245 (0,070)	7,47 (2,96)	6,0 (2,41)	1,60 (0,50)	
Skirrhus pylori mit Metastasen (Obd.-Diagn.)	do.	6,944	0,4536 (0,1694)	0,360 (0,1515)	0,0835 (0,0231)	6,54 (2,43)	5,19 (2,18)	1,20 (0,33)	
Mammakrebs mit Metastasen	do.	7,879	0,9905	0,7595	0,2338	12,6	9,65	2,98	
Phthisis 1	starke Kachexie	16,812	1,198	0,952	0,246	7,14	5,67	1,47	Diazo-Reaktion +.
„ 2	do.	16,128	1,230 (0,399)	1,008 (0,354)	0,231 (0,0448)	7,65 (2,48)	6,27 (2,20)	1,43 (0,28)	Diazo-Reaktion +.
„ 3	moribund	31,64	1,408	1,048	0,316	4,46	3,33	1,00	Diazo-R. +; Tagesmenge 350 ccm.
„ 4	do.	13,244	1,267 (0,4676)	1,015 (0,378)	0,256 (0,0742)	9,6 (3,53)	7,65 (2,86)	1,94 (0,56)	Diazo-R. +; Tagesmenge 550 ccm.
„ 5	do.	10,455	0,6636 (0,3724)	0,5502 (0,2954)	0,1113 (0,0462)	6,32 (3,55)	5,25 (2,82)	1,06 (0,44)	Diazo-Reaktion +.

Die Zahlen in Klammern bedeuten die Werte nach Salomon-Saxlscher Methode. (Obd.-Diagn.) = (Obduktionsdiagnose).

III. Anwendung der Methode.

1. Der Oxyproteinsäure-N-Gehalt im normalen Harn.

Zur Ermittlung des Oxyproteinsäure-N-Gehaltes im normalen Harn wurde eine Mischung verschiedener Harne verwendet.

Der Harn wurde nach gutem Durchschütteln mit Toluol aufbewahrt; in diesem Zustande erfuhr der Oxyproteinsäuregehalt binnen mehreren Wochen keine Änderung.

Ein Liter normalen Harns enthält 0,57 bis 0,73 g Baryt-N und 0,45 bis 0,53 g Oxyproteinsäure-N. Wenn man dies mit dem Gesamt-N vergleicht, so erhält man für den normalen Harn einen äußerst konstanten Prozentsatz; für den Baryt-N 5,9 bis 6,3 %, für den Oxyproteinsäure-N 4,3 bis 4,7 %; dagegen schwankte der sog. „Rest-N-Gehalt" etwas mehr (1,2 bis 1,8 %).

Daß Ginsberg nach seiner Methode im normalen Harn ein individuell stärkeres Schwanken des Oxyproteinsäure-N fand, schreibt Gawinski dem Umstande zu, daß jener bei der Ausarbeitung seiner Methode die Vorbehandlung des Harnsirups mit H_2SO_4 und Alkohol versäumte. Dieser Vorwurf scheint mir auch ganz berechtigt. Wenn ferner Salomon und Saxl Zweifel in die Behauptung Gawinskis und Ginsbergs setzen, ihre Barytfraktion sei frei von anderen N-haltigen Harnsubstanzen, so muß auch ich nach meinen Erfahrungen den ersteren recht geben und gerade auf den genannten Fehler führe ich die relativ stärkeren Schwankungen des Oxyproteinsäure-N im mormalen Harn in Gawinski's Analysen zurück. Während aber das Salomon-Saxlsche Verfahren sicherlich nicht der Gefahr ausgesetzt ist, Harnstoff-N usw. mitzubestimmen[1]), so ist es doch als eine quantitative Bestimmungsmethode der gesamten Oxyproteinsäuren aus den oben angeführten Gründen unbrauchbar und ihre Angaben bedürfen daher diesbezüglich einer Berichtigung.

2. Der Oxyproteinsäure-N-Gehalt im pathologischen Harn.

Mit Rücksicht auf frühere Angaben über den Oxyproteinsäure- bzw. Neutralschwefel-Gehalt im pathologischen Harn[2])

[1]) Die Barytfraktion nach Salomon-Saxl war entweder ganz oder wenigstens praktisch frei von Harnstoff (Xanthydrolreaktion).

[2]) Über die Vermehrung der Oxyproteinsäureausscheidung usw. — Vergl. O. v. Fürth, Probl. d. physiol. u. path. Chemie I 546 ff u. II 143.

habe ich sieben Carcinomfälle ohne oder mit Kachexie, fünf schwere Fälle von Lungentuberkulose und einen Fall von Morbus Recklinghausen (zuerst als Carcinom diagnostiziert) der Untersuchung unterzogen. Die Fälle, bei denen ich nach meiner Methode deutliche Vermehrung der Oxyproteinsäuren konstatierte, wurden auch nach dem Salomon-Saxlschen Verfahren untersucht, um die Richtigkeit der diesbezüglichen Angaben zu kontrollieren.

Es ergab sich nun, wie die Tabelle zeigt, daß der Oxyproteinsäure-N bei kachektischen Carcinomatösen und schweren Phthisikern in der Regel mehr oder minder stark relativ vermehrt ist; (über 5 % bis 9,65 % des Gesamt-N). Dagegen findet in den meisten Fällen von Carcinom, die von keiner Kachexie begleitet sind, keine Vermehrung des Oxyproteinsäure-N statt (4,1, 4,4, einmal 3,1 %).

Die untersuchten Fälle von Carcinomharn ergaben nach Salomon-Saxls Methode auch gegenüber normalem Harn etwas erhöhte Werte des Oxyproteinsäure-N (2,0, 2,2 und 2,4 %). Dasselbe wurde aber auch bei Phthisikerharnen konstatiert (2,2, 2,8 und 2,9 %).

Aus dem erwähnten Befunde erhellt deutlich, daß die vermehrte Ausscheidung der Oxyproteinsäuren kein charakteristisches Symptom der Krebskrankheit ist, vielmehr höchst wahrscheinlich mit der begleitenden Kachexie zusammenhängt. Diese Behauptung glaube ich auf Grund meiner Untersuchungen auch bezüglich der nach Salomon und Saxl bestimmbaren Fraktion von Oxyproteinsäuren aufstellen zu dürfen.

Zusammenfassung.

1. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, welche die N-Menge der Oxyproteinsäuregruppe im Harn quantitativ zu ermitteln gestattet. Die neue Methode unterscheidet sich von den bisherigen besonders dadurch, daß sie mittels zweckmäßiger Verwendung der Kieselgur ohne die Gefahr, Harnstoff und andere stickstoffhaltige Harnbestandteile mitzubestimmen, die gesamte N-Menge der Oxyproteinsäuren auswertet.

Die so gewonnene „Barytfraktion" enthält keine wesentliche Menge von Harnstoff (nicht mehr als 4 % des Baryt-N),

Ammoniak (2 bis 4 % des Baryt-N), Aminosäuren und anderen stickstoffhaltigen Harnsubstanzen und umfaßt außer dem Oxyproteinsäure-N nur den sog. „Rest-N", der mit Quecksilberacetat und Soda nicht fällbar ist. Der Harnstoff kann durch oftmalige vorsichtige Extraktion mit Alkohol vollständig beseitigt werden. Der Ammoniak dürfte bei der Bestimmungsprozedur aus Oxyproteinsäuren neu entstanden sein und gleiches scheint auch für die Aminosäuren zu gelten.

Die Barytfraktion wurde in bezug auf einige Eigenschaften (Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure und Bleiessig und Hydrolysierbarkeit mit Säure oder Alkali) studiert.

2. Die bisherigen Methoden zur Oxyproteinsäurebestimmung wurden kritisch überprüft, wobei sich u. a. ergab, daß die Salomon-Saxlsche Methode nur ca. ein Drittel des wirklich anwesenden Oxyproteinsäure-N bestimmt, während sie den Hauptteil desselben mit dem Filtrate verliert. Die verloren gegangene Menge ist nach der neuen Methode im Filtrate quantitativ nachweisbar.

Gleichzeitig wurde festgestellt, daß dreierlei Ursachen die Schuld an dem großen Verlust der Ausbeute beim Verfahren nach Salomon und Saxl tragen: 1. die Fällung mit Ätheralkohol aus allzu verdünnter Lösung, 2. die versäumte Überführung der Alkalisalze der Oxyproteinsäuren in ihre Barytsalze durch Behandlung mit Schwefelsäure und Baryt, 3. die Unterlassung der Entfernung anorganischer Sulfate durch Alkohol nach dem Schwefelsäurezusatze.

Die Fehlerquellen 2 und 3 sind auch bei der Ginsbergschen Methode nicht ausreichend berücksichtigt worden; doch haben sie sich angesichts der dabei geübten Fällung aus sehr konzentrierter Lösung nicht wesentlich bemerkbar gemacht.

Der nach Salomon und Saxl fällbare Oxyproteinsäureanteil umfaßt die Hauptmenge des Urochroms.

3. Der Menschenharn enthält durchschnittlich 4,5 % des Gesamt-N in Form von Oxyproteinsäure-N und dieses Verhältnis ist bei normalem Mischharn sehr konstant (4,3 bis 4,7 %). Der sog. „Rest-N" unterliegt einer relativ stärkeren Schwankung (1,2 bis 1,8 %).

Bei kachektischen Carcinomkranken und Phthisikern wurde eine abnorme Vermehrung des Oxyproteinsäure-N konstatiert (über 5 % bis 9,6 %). Diese Vermehrung ist aber bei den genannten Krankheiten nicht konstant und kann nicht als ein charakteristisches System der Krebskrankheit angesehen werden.

Bei jenen Fällen von Carcinom und Tuberkulose, wo sich die Gesamtoxyproteinsäurefraktion vermehrt findet, war auch eine Vermehrung der Salomon-Saxlschen Fraktion zu konstatieren.

Über die Bindungsverhältnisse zwischen Antikörper und Antigen.

Von

Friedericke Krauß.

(Aus dem Hygienischen Institut der Deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 12. Mai 1914.)

Die nachfolgend mitgeteilten Versuche hatten einen doppelten Zweck:

Zunächst hatte Weil[1]) bei der Untersuchung der Bindungsfähigkeit hämolytischer Immunkörper für Schafblutkörperchen festgestellt, daß dieselben je nach der Tierart, von welcher die Immunsera gewonnen sind, eine ganz verschiedene ist, indem die Bindungskörper aus Kaninchenimmunsera sehr viel (100 bis 150 lösende Dosen), aus Meerschweinchenimmunsera nur sehr wenig (2 bis 5 lösende Dosen) Hämolysin binden, obwohl die absolute hämolytische Kraft der beiden Serumsorten keine solchen Differenzen aufweist, daß diese zur Erklärung herangezogen werden könnten. Es sollte nun untersucht werden, ob bei bakteriellen Antiseren, die mittels der Komplementbindung an sich und nach Behandlung mit den betreffenden Bakterien geprüft wurden, ähnliche Unterschiede auftreten würden.

Es wurden aus diesem Grunde sowohl Kaninchen als auch Meerschweinchen mit verschiedenen Bakterien vorbehandelt. (Cholera 74, Typhus K, Vibrio a 10875/11 leuchtend und Vibrio g 11608/11 nicht leuchtend) und hierauf die Bindungskraft der homologen Bakterien geprüft. Da die Ansicht besteht, daß sich Meerschweinchen zur Erzeugung antibakterieller Immunkörper nur wenig eignen, so wurden diese Tiere sehr intensiv vorbehandelt und in einem Zwischenraum von

[1]) Diese Zeitschr. 58, H. 4/5.

6 Tagen mit je einer Öse der obengenannten, abgetöteten Bakterien in 1 ccm NaCl intraperitoneal injiziert. Wir geben gleich eine Reihe von Versuchen wieder, die diese Verhältnisse illustrieren. Versuche 1 bis 4.

Versuch I.

Komplementbindung mit verschiedenen Immunseren.

Kaninchen-Typhus-Immunserum + Typhus-Emulsion			Resultat	Meerschweinchen-Immunserum-Thyphus + Typhus-Emulsion[1])			Resultat
Immunserum unbehandelt	1. 0,01 ccm + 0,3 ccm 2. 0,005 „ + 0,3 „ 3. 0,0025 „ + 0,3 „ 4. 0,001 „ + 0,3 „ 5. 0,01 Kontr. —	Zu allen Röhrchen 0,05 Kompl. u. nach 1Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibil. Hammelblutkörperchen	0 0 0 Sp k	Immunserum unbehandelt	1. 0,01 ccm + 0,3 ccm 2. 0,005 „ + 0,3 „ 3. 0,0025 „ + 0,3 „ 4. 0,001 „ + 0,3 „ 5. 0,01 Kontr. —	Zu allen Röhrchen 0,05 Kompl. u. nach 1Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibil. Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 k
0,1 ccm Immunserum wurde mit den Bakter. einer Kultur 1/2 Std. bei 37° behandelt, dann klar zentrifugiert	6. 0,01 ccm + 0,3 ccm 7. 0,005 „ + 0,3 „ 8. 0,0025 „ + 0,3 „ 9. 0,001 „ + 0,3 „ 10. — + 0,3 „		f. k k k k k	0,1 ccm Meerschweinchen-Typhus-Immunserum mit einer Kultur 1/2 Std. behandelt, dann klar zentrifugiert	6. 0,01 ccm + 0,3 ccm 7. 0,005 „ + 0,3 „ 8. 0,0025 „ + 0,3 „ 9. 0,001 „ + 0,3 „ 10. — + 0,3 „		k k k k k

Versuch 2.

Kaninchen-Cholera-Immunserum + Cholera-Emulsion			Resultat	Meerschweinchen-Cholera-Immunserum + Cholera-Emulsion			Resultat
Serum unbehandelt	1. 0,01 ccm + 0,3 ccm 2. 0,005 „ + 0,3 „ 3. 0,0025 „ + 0,3 „ 4. 0,001 „ + 0,3 „ 5. 0,01 Kontr. —	Zu allen Röhrchen 0,05 Kompl. u. nach 1Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibil. Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 k	Serum unbehandelt	1. 0,01 ccm + 0,3 ccm 2. 0,005 „ + 0,3 „ 3. 0,0025 „ + 0,3 „ 4. 0,001 „ + 0,3 „ 5. 0,01 Kontr. —	Zu allen Röhrchen 0,05 Kompl. u. nach 1Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibil. Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 k
0,1 ccm Immunserum wurde mit den Bakter. einer Kultur 1/2 Std. bei 37° behandelt, dann klar zentrifugiert	6. 0,01 ccm + 0,3 ccm 7. 0,005 „ + 0,3 „ 8. 0,0025 „ + 0,3 „ 9. 0,001 „ + 0,3 „ 10. — + 0,3 „		f. k k k k k	0,1 ccm Meerschweinchen-Immunserum mit einer Kultur 1/2 Std. behandelt, dann ganz klar zentrifugiert	6. 0,01 ccm + 0,3 ccm 7. 0,005 „ + 0,3 „ 8. 0,0025 „ + 0,3 „ 9. 0,001 „ + 0,3 „ 10. — + 0,3 „		k k k k k

Zeichenerklärung: 0 = keine Lösung,
f. k = fast komplett,
st = starke Lösung,
Sp = eine Spur Lösung,
k = komplette Lösung.

[1]) Emulsion-Bakterien einer Kultur + 15 ccm NaCl. Die zu verwendende Menge von der Emulsion wurde immer in einem Vorversuch festgestellt.

Versuch 3.

Kaninchen-Vibrio a-Immunserum + Vibrio a-Emulsion = 1 Kultur + 20 ccm NaCl			Resultat	Meerschweinchen-Vibrio a-Immunserum + Vibrio a-Emulsion			Resultat
Immunserum unbehandelt	1. 0,005 ccm + 0,25 ccm 2. 0,0025 „ + 0,25 „ 3. 0,001 „ + 0,25 „ 4. 0,0005 „ + 0,25 „ 5. 0,00025 „ + 0,25 „ 6. 0,005 Kontr. —	Zu jedem Röhrchen 0,05 Komplement u. nach 1 Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilis. Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 Sp k	Immunserum unbehandelt	1. 0,005 ccm + 0,25 ccm 2. 0,0025 „ + 0,25 „ 3. 0,001 „ + 0,25 „ 4. 0,0005 „ + 0,25 „ 5. 0,00025 „ + 0,25 „ 6. 0,005 Kontr. —	Zu jedem Röhrchen 0,05 Komplement u. nach 1 Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilis. Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 0 k
0,1 ccm Kaninchen-Immunserum Vibrio a wurde mit den Bakter. einer Kultur 1/2 Std. behandelt, dann klar zentrifugiert	7. 0,005 ccm + 0,25 ccm 8. 0,0025 „ + 0,25 „ 9. 0,001 „ + 0,25 „ 10. 0,0005 „ + 0,25 „ 11. 0,00025 „ + 0,25 „ 12. — + 0,25 „		s. st f. k k k k k	0,1 ccm Meerschweinchen-Immunserum Vibrio a mit einer Kultur 1/2 Std. bei 37° behandelt, dann klar zentrifugiert	7. 0,005 ccm + 0,25 ccm 8. 0,0025 „ + 0,25 „ 9. 0,001 „ + 0,25 „ 10. 0,0005 „ + 0,25 „ 11. 0,00025 „ + 0,25 „ 12. — + 0,25 „		f. k k k k k k

Versuch 4.

Kaninchen-Vibrio g-Immunserum + Vibrio g-Emulsion = 1 Kultur + 20 ccm NaCl			Resultat	Meerschweinchen-Immunserum Vibrio g + Vibrio g-Emulsion			Resultat
Immunserum unbehandelt	1. 0,005 ccm + 0,2 ccm 2. 0,0025 „ + 0,2 „ 3. 0,001 „ + 0,2 „ 4. 0,0005 „ + 0,2 „ 5. 0,00025 „ + 0,2 „ 6. 0,005 Kontr. —	Zu jedem Röhrchen 0,05 Komplement u. nach 1 Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilis. Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 0 k	Immunserum unbehandelt	1. 0,005 ccm + 0,2 ccm 2. 0,0025 „ + 0,2 „ 3. 0,001 „ + 0,2 „ 4. 0,0005 „ + 0,2 „ 5. 0,00025 „ + 0,2 „ 6. 0,005 Kontr. —	Zu jedem Röhrchen 0,05 Komplement u. nach 1 Std. je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilis. Hammelblutkörperchen	0 0 0 0 0 k
0,1 ccm Kaninchen-Immunserum Vibrio g wurde mit einer Kultur 1/2 Std. behandelt, dann ganz klar zentrifugiert	7. 0,005 ccm + 0,2 ccm 8. 0,0025 „ + 0,2 „ 9. 0,001 „ + 0,2 „ 10. 0,0005 „ + 0,2 „ 11. 0,00025 „ + 0,2 „ 12. — + 0,2 „		f. k k k k k k	0,1 ccm Meerschweinchen-Immunserum Vibrio g wurde mit einer Kultur 1/2 Std. bei 37° behandelt, dann klar zentrifugiert	7. 0,005 ccm + 0,2 ccm 8. 0,0025 „ + 0,2 „ 9. 0,001 „ + 0,2 „ 10. 0,0005 „ + 0,2 „ 11. 0,00025 „ + 0,2 „ 12. — + 0,2 „		k k k k k k

Aus diesen Versuchen geht zunächst hervor, daß es gelingt, auch bei Meerschweinchen sehr wirksame, komplementbindende Immunsera zu erzeugen, und zwar mindestens von der Stärke wie beim Kaninchen, wenn man nur die entsprechende Vorbehandlung wählt. Weiter aber zeigen diese Versuche, daß die Immunkörper des Meerschweinchens in derselben Weise gebunden werden, wie die des Kaninchens, daß also für die komplementbindenden Antikörper jene Erscheinung, die bei den Hämolysen in so auffallender Weise hervortritt, nicht zu konstatieren ist. Die hier verwendeten vier verschiedenen Bakterienstämme (Typhus, Cholera, Vibrio a und Vibrio g) weisen bezüglich ihrer Bindungskraft keine wesentlichen Differenzen auf.

Versuche 5 und 6.

Der Bakterieninhalt einer Kolleschen Schale Cholera 74 wurde mit 20 ccm NaCl abgespült, 1 Stunde bei 60° extrahiert, danach vollkommen klar zentrifugiert. Abguß-Extrakt (der Bodensatz wurde ebenfalls zum Versuch verwendet). Kaninchen-Immunserum wurde in der Verdünnung 1 : 10 $^1/_2$ Stunde bei 71° erhitzt. Zu Versuch 6 Meerschweinchen-Immunserum Cholera 74 in der Verdünnung 1 : 10 $^1/_2$ Stunde bei 71°.

Versuch 5. Kaninchen-Cholera-Immunserum 71°, Verdünnung 1 : 10 + Extrakt				Resultat	Versuch 6. Resultat des Vers. 6, genaue Anordnung wie 6, nur Meerschweinchen-Immunserum	
I. Extrakt-Immunserumgemisch	1. 0,25 ccm	+ 0,15 ccm	Nach 1 Stunde bei 37° werden alle Röhrchen ganz klar zentrifugiert. Zu allen Abgüssen 0,05 Komplement, zu III nachträglich 0,15 Extrakt und nach einer weiteren Stunde je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen.	0	I	1. 0
	2. 0,1 „	+ 0,15 „		0		2. 0
	3. 0,05 „	+ 0,15 „		0		3. 0
	4. 0,025 „	+ 0,15 „		0		4. 0
	4. 0,01 „	+ 0,15 „		Spürchen		5. 0
	6. 0,025 „	Kontrolle + —		k		6. k
II. Zu diesen Röhrchen nach 1 Stunde je eine Öse der als Bodensatz bei der Extraktbereitg. zurückgeblieben. Bakterien. Nach 1 weit. Stunde wurden alle 17 Röhrchen zentrifugiert.	7. 0,25 ccm	+ 0,15 ccm		f. k	II	7. f. k
	8. 0,1 „	+ 0,15 „		k		8. k
	9. 0,05 „	+ 0,15 „		k		9. k
	10. 0,025 „	+ 0,15 „		k		10. k
	11. 0,01 „	+ 0,15 „		k		11. k
	12. —	Kontrolle + 0,15 „		k		12. k
III. genau wie bei II.	13. 0,25 ccm	+ 0,15 ccm NaCl		f. k	III	13. f. k
	14. 0,1 „	+ 0,15 „		k		14. k
	15. 0,05 „	+ 0,15 „		k		15. k
	16. 0,025 „	+ 0,15 „		k		16. k
	17. 0,01 „	+ 0,15 „		k		17. k

Da wir nun über eine Anzahl von Immunseris und Bakterien mit guter Bindungskraft verfügten, so wollten wir die weitere Frage im Zusammenhang untersuchen, wie sich die komplementbindenden Immunkörper den Bakterien gegenüber verhalten, wenn sie mit gelöstem Antigen (Extrakt) in Reaktion getreten sind.

Bekanntlich ist durch Weil, Weil-Spät, Tojosumi, F. Krauß gezeigt worden, daß Bakterien aus einer Mischung von gelöstem Extrakt, der gleichen Art von Immunserum, welche Mischung an sich Komplement bindet, die komplementbindenden Immunkörper gerade so gut und leicht herausnehmen, wie aus einer unter den gleichen Verhälltnissen hergestellten Mischung von Immunserum mit einer ganz indifferenten Flüssig-

Versuche 7 und 8.

Extraktbereitung wie bei 5, nur mit Typhus. Zu Versuch 7 Kaninchen-Typhus-Immunserum, zu 8 Meerschweinchen-Typhus-Immunserum in der Verdünnnng 1 : 10 $^1/_2$ Stunde bei 71°.

Versuch 7. Kaninchen-Typhus-Immunserum 71°, Verdünnung 1 : 10 + Extrakt Typhus					Resultat	Versuch 8. Resultat des Vers. 8, bei genau derselben Versuchsordn. wie 7, nur mit Meerschweinchen-Immunserum	
I. Extrakt-Immunserumgemisch	1. 0,6 ccm		+ 0,3 ccm	Zu allen Röhrchen nach 1 Stunde bei 37° 0,05 Komplement, zu III nachträglich 0,3 Extrakt und nach einer weiteren Stunde je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen.	0	I	1. 0
	2. 0,3 „		+ 0,3 „		0		2. 0
	3. 0,1 „		+ 0,3 „		0		3. 0
	4. 0,06 „		+ 0,3 „		0		4. 0
	5. 0,03 „		+ 0,3 „		st.		5. 0
	6. 0,6 „	Kontrolle	—		k		6. k
II. Zu diesen Röhrchen nach 1 Stunde bei 37° je 2 Ösen der bei der Extraktbereitung als Bodensatz zurückgebliebenen Bakterien. Nach 1 weiteren Stunde wurden alle 17 Röhrchen zentrifugiert	7. 0,6 ccm		+ 0,3 ccm		st.	II	7. f. k.
	8. 0,3 „		+ 0,3 „		f. k		8. k
	9. 0,1 „		+ 0,3 „		k		9. k
	10. 0,06 „		+ 0,3 „		k		10. k
	11. 0,03 „		+ 0,3 „		k		11. k
	12. —	Kontrolle	+ 0,3 „		k		12. k
III. wie bei II.	13. 0,6 ccm		+ 0,3 ccm NaCl		st.	III	13. f. k.
	14. 0,3 „		+ 0,3 „		f. k		14. k
	15. 0,1 „		+ 0,3 „		k		15. k
	16. 0,06 „		+ 0,3 „		k		16. k
	17. 0,03 „		+ 0,3 „		k		17. k

keit (NaCl). Daraus konnte mit aller Sicherheit der Schluß gezogen und durch weitere Versuche von Spät mit Tuberkelbacillen und F. Krauß mit Vibrio a 10875/11 leuchtend[1]) bestätigt worden, daß zwischen Immunkörper und Antigen, vorausgesetzt daß letzteres wirklich in gelöster Form vorliegt und auch während des Versuches nicht corpuscular wird, eine Bindung unmöglich entstehen kann, wenn auch die bei Zusammenbringen von Extrakt und Immunserum jederzeit nachweisbare Komplementbindung auf eine solche hinzudeuten scheint. Versuche 5 und 6.

Diese Versuche lehren, daß sowohl aus den Kaninchen-Immunserum als auch aus dem des Meerschweinchens die Bakterien genau soviel Immunkörper binden, ob nun der Extrakt

[1]) Diese Zeitschr. **56**, Heft 5 und 6.

Versuche 9 und 10.

Extraktbereitung wie bei 5, nur diesmal mit Vibrio a. Zu Versuch 9 Vibrio a Kaninchen-Immunserum, zu 10 Meerschweinchen-Immunserum Vibrio a in der Verd. 1 : 10 ½ Stunde bei 71° erhitzt.

Versuch 9. Kaninchen-Immunserum 71°, Verd. 1 : 10 + Extr. Vibrio a.					Resultat	Versuch 10. Resultat des Vers. 10, bei derselben Versuchsanordnung, nur m. Meerschweinchen-Immunserum	
I. Extrakt-Immunserumgemische	1. 0,6 ccm		+ 0,15 ccm	Zu allen Röhrchen nach 1 Stunde nach dem Zentrifugieren 0,05 Komplement, zu III nachträglich 0,15 Extrakt und nach einer weiteren Stunde je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen.	0	I	1. 0
	2. 0,3 „		+ 0,15 „		0		2. 0
	3. 0,1 „		+ 0,15 „		0		3. 0
	4. 0,06 „		+ 0,15 „		0		4. 0
	5. 0,03 „		+ 0,15 „		Spur		5. 0
	6. 0,6 „	Kontrolle	—		k		6. k
II. Zu diesen Verdünnungen nach 1 Stunde je 2 Ösen der als Bodensatz bei d. Extraktbereitung zurückgebliebenen Bakterien, nach 1 Stunde wurden alle 17 Röhrchen zentrifugiert	7. 0,6 ccm		+ 0,15 ccm		deutl.	II	7. f. k
	8. 0,3 „		+ 0,15 „		s. st.		8. k
	9. 0,1 „		+ 0,15 „		f. k		9. k
	10. 0,06 „		+ 0,15 „		k		10. k
	11. 0,03 „		+ 0,15 „		k		11. k
	12. —	Kontrolle	+ 0,15 „		k		12. k
III. wie bei II	13. 0,6 ccm		+ 0,15 ccm NaCl		deutl.	III	13. s. st.
	14. 0,3 „		+ 0,15 „		s. st.		14. f. k
	15. 0,1 „		+ 0,15 „		k		15. k
	16. 0,06 „		+ 0,15 „		k		16. k
	17. 0,03 „		+ 0,15 „		k		17. k

anwesend ist und auch auf das Immunserum hätte einwirken können (Kolumne 2) oder nicht (Kol. 3). Genau dasselbe Resultat ergeben die Versuche 7 und 8. Diese letzteren sind insofern von Interesse, als bereits von Weil Versuche mit Typhus mit negativem Resultat angestellt wurden. Es handelte sich, wie er angibt, um einen schwach bindenden Stamm, so daß damit die negativen Resultate erklärt wurden. Wendet man jedoch, wie in diesem Versuche, einen Typhusstamm mit stärkeren aviden Gruppen an, so unterscheidet sich dieser nicht von den übrigen Bakterienstämmen. Auch für Vibrio a gelten, wie aus den Versuchen 9 und 10 hervorgeht, dieselben Verhältnisse. Ja, es hat sogar den Anschein, als ob die Immunkörper bei Gegenwart von Extrakt besser gebunden würden (Vers. 10, Kol. 2) als bei Gegenwart von NaCl (3). Wenn wir auch diesen geringen Differenzen, die auch in anderen Versuchen (Versuche 11 und 12)

Versuch 11 und 12.

Extraktbereitung wie bisher, mit Vibrio g. Zu Versuch 11 Kaninchen-Immunserum Vibrio g. Zu 12 Vibrio g Meerschweinchen-Immunserum in der Verdünnung 1 : 10 $^1/_2$ Stunde bei 71° erhitzt.

Versuch 11. Kaninchen-Immunserum, Verd. 1 : 10 + Extrakt Vibrio g.					Resultat	Versuch 12. Resultat des Vers. 12, bei derselben Versuchsanordnung wie 11, nur mit Meerschweinch.-Immunserum Vibrio g.	
I. Extrakt-Immunserumgemisch	1. 0,6 ccm		+ 0,2 ccm	Nach dem Zentrifugieren zu allen Röhrchen 0,06 Komplement, zu III nachträglich 0,2 Extrakt und nach 1 weiteren Stunde je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen.	0	I	1. 0
	2. 0,3 „		+ 0,2 „		0		2. 0
	3. 0,1 „		+ 0,2 „		0		3. 0
	4. 0,06 „		+ 0,2 „		0		4. 0
	5. 0,03 „		+ 0,2 „		0		5. 0
	6. 0,6	Kontrolle	+ 0,2 „		k		6. k
II. Zu diesen Röhrchen nach 1 Stunde je 2 Ösen der als Bodensatz bei der Extraktbereitung zurückgebliebenen Bakterien. Nach 1 weiteren Stunde wurden alle 17 Röhrchen zentrifugiert	7. 0,6 ccm		+ 0,2 ccm		deutl.	II	7. f. k
	8. 0,3 „		+ 0,2 „		f. k		8. k
	9. 0,1 „		+ 0,2 „		k		9. k
	10. 0,06 „		+ 0,2 „		k		10. k
	11. 0,6 „		+ 0,2 „		k		11. k
	12. —	Kontrolle	+ 0,2 „		k		12. k
III. wie bei II	13. 0,6 ccm		+ 0,2 ccm NaCl		deutl.	III	13. f. k
	14. 0,3 „		+ 0,2 „		stark		14. f. k
	15. 0,1 „		+ 0,2 „		f. k		15. k
	16. 0,06 „		+ 0,2 „		k		16. k
	17. 0,03 „		+ 0,2 „		k		17. k

auftreten, keine große Bedeutung beimessen, so weisen sie doch darauf hin, daß der Extrakt mit den Immunkörpern in keine Bindungsreaktion getreten sein kann. Versuch 11 und 12.

Auch diese Experimente weichen von den vorigen in keiner Weise ab. Aus diesen Versuchen, die mit den Immunseris verschiedener Tiere und verschiedener Bakterien angestellt wurden, zeigt sich nun neuerdings mit Sicherheit, daß die Anwesenheit des Antigens, solange es in gelöster Form (Extrakt) verwendet wird, nicht etwa durch Einwirkung des Immunserums als Präcipitat sich vorfindet, mit den Immunkörpern in keiner Weise in Verbindung tritt. Letzterer Umstand muß genau bei den Experimenten berücksichtigt werden. Deshalb ist es nötig, die Sera gut zu inaktivieren, um eine sichtbare Präcipitation auszuschalten.

Dies allein genügt jedoch noch keineswegs, denn wir wissen, daß das Zentrifugieren Flockenreaktionen beschleunigt. So beruht ja die Agglutinationsbeschleunigung, die von Goethgens angegeben wurde, auf dieser Erscheinung. Es wäre sonach möglich, daß selbst bei Ausbleiben einer sichtbaren Präcipitation durch das Zentrifugieren sich ein Präcipitat bildet, welches dann einen Teil der Immunkörper bindet. Es wäre dann natürlich die Vorstellung, daß aus dem Extrakt-Immunserumgemisch die nachträglich hinzugefügten Bakterien die Immunkörper frei vorgefunden hätten — unrichtig, da sich ja, wenn es zur Bildung eines Präcipitates gekommen wäre, die Immunkörper nicht in den Bakterien, sondern in dem beim Zentrifugieren gebildeten Präcipität verankert vorfänden. Aus dem Grunde müssen die Gemische von Extrakt und Immunserum vor der Hinzufügung der Bakterien gut zentrifugiert werden und dann noch ungeschwächte Komplementbindung aufweisen. Selbst wenn sich dann noch ein Präcipitat gebildet hätte, so würde dieses für den weiteren Verlauf der Versuche ohne Bedeutung sein, da jetzt in der überstehenden Flüssigkeit nur die kolloidal gelösten, nicht zentrifugierbaren Extraktbestandteile vorhanden sind.

Da nun bei genauester Befolgung dieser Kautelen unsere sämtlichen Versuche eindeutig in der von uns beschriebenen Weise ausgefallen sind, so geht daraus neuerdings mit Sicherheit hervor, daß eine Reaktion zwischen Antigen und Antikörper zustande kommen kann, ohne daß eine Verankerung zwischen den beiden eintritt.

Versuche über die Veränderungen von Blutkörperchen durch Osmium und Alkohol.

Von

Margarete Thorsch.

(Aus dem Hygienischen Institut in Prag.)

(Eingegangen am 12. Mai 1914.)

Die antigene Fähigkeit der roten Blutkörperchen hat durch die Versuche von Dungern und Coca erneutes Interesse gewonnen. Diese Autoren konnten zeigen, daß osmierte Erythrocyten — obzwar sie Hämolysine banden, solche nicht erzeugten — und sie haben daraus den Schluß gezogen, daß die Bindung mit der Antigenität in keiner Beziehung stehe.

Szily hat demgegenüber nachgewiesen, daß die Bindung der osmierten Blutkörper unspezifisch ist, da auch die Blutzellen artfremder Tiere, die mit Osmium vorbehandelt waren, in genau derselben Weise die Hämolysine verankerten wie spezifische Erythrocyten. Damit war der Umstand, daß osmierte Blutkörperchen nicht antigen wirken, erklärt.

Wir haben, ausgehend von der Tatsache, daß Alkoholblutkörperchen des Hammels spezifische Hämolysine erzeugen, die Bindungsverhältnisse genau geprüft und gefunden, daß diese sich hinsichtlich der Immunkörperfixation genau so verhalten wie die osmierten, indem sowohl die mit Alkohol behandelten Blutkörperchen des Hammels als auch die von Kaninchen und Meerschweinchen in gleicher Weise die Hammelbluthämolysine verankerten. Es war also durch diese Versuchsanordnung eine Spezifität des Vorganges nicht zu erkennen. Durch die Anwendung der Komplementbindungsreaktion konnten wir jedoch leicht den Nachweis erbringen, daß die Alkoholblutkörperchen des Hammels im Gegensatz zu denen der andern Tierarten die Hammelbluthämolysine spezifisch verankerten; denn wäh-

Versuch 1.

10 ccm Hammelblut werden gewaschen und davon 5 ccm in 10 ccm Alkohol und 5 ccm in 7 ccm 1 %igem Osmium, das mit 7 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde, aufgeschwemmt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, danach zentrifugiert und mehrmals gewaschen.

I. Hammelblut unbehandelt ccm	+ Hämolytisches Immunserum ccm	+ Meerschweinchen-Komplement ccm	Nach 1 Stunde bei 37° zu jedem Röhrchen je 1 ccm 5 %ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen.	Resultat
0,25	0,1	0,075		0
0,25	0,05	0,075		0
0,25	0,01	0,075		0
0,25	0,005	0,075		0
0,25	—	0,075		k
II. Hammelblut mit Alkohol behandelt ccm	**+ Hämolytisches Immunserum ccm**	**+ Komplement ccm**		
0,25	0,1	0,075		0
0,25	0,05	0,075		0
0,25	0,01	0,075		0
0,25	0,005	0,075		0
0,25	—	0,075		k
III. Hammelblut mit Osmium behandelt ccm	**+ Hämolytisches Immunserum ccm**	**+ Komplement ccm**		
0,25	0,1	0,075		k
0,25	0,05	0,075		k
0,25	0,01	0,075		k
0,25	0,005	0,075		k

Zeichenerklärung: k = komplette Lösung,
f k = fast komplette Lösung,
w = wenig Lösung,
Sp = Spur Lösung,
0 = keine Lösung.

rend erstere komplementbindend wirkten, verhielten sich die der fremden Tierarten vollkommen negativ. Damit konnte man im Sinne der herrschenden Anschauung in der Tat die Antigenität der Alkoholblutkörperchen erklären, da ja ihre spezifischen Gruppen zumindest für komplementbindende Antikörper intakt geblieben waren.

Es entstand nun die Frage, ob man durch diese Versuchsanordnung auch bezüglich der Art und Weise der Bindungs-

Versuch 2.

10 ccm Hammelblut werden gewaschen und davon 5 ccm in 10 ccm Alkohol und 5 ccm in 7 ccm 1%igem Osmium, das mit 7 ccm NaCl verdünnt wurde, aufgeschwemmt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach zentrifugiert und mehrmals gewaschen.

I.	Hammelblut unbehandelt ccm	+ Hämolytisches Immunserum ccm	+ Komplement ccm	Nach 1 Stunde bei 37° zu jedem Röhrchen je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen	Resultat
	0,25	0,1	0,075		0
	0,25	0,05	0,075		0
	0,25	0,01	0,075		0
	0,25	0,005	0,075		0
	0,25	—	0,075		k
II.	Hammelblut mit Alkohol behandelt ccm	+ Hämolytisches Immunserum ccm	+ Komplement ccm		
	0,25	0,1	0,075		0
	0,25	0,5	0,075		0
	0,25	0,01	0,075		0
	0,25	0,005	0,075		0
	0,25	—	0,075		k
III.	Hammelblut mit Osmium behandelt ccm	+ Hämolytisches Immunserum ccm	+ Komplement ccm		
	0,25	0,1	0,075		k
	0,25	0,05	0,075		k
	0,25	0,01	0,075		k
	0,25	0,005	0,075		k
	0,25	—	0,076		k

fähigkeit der osmierten Blutkörperchen Aufschluß erlangen konnte. Denn da diese nach übereinstimmenden Versuchen nicht die Fähigkeit besitzen, Antikörper zu erzeugen, so müßten ihre spezifischen bindenden Gruppen durch das Osmium eine Schädigung erfahren haben und sich der Komplementbindung gegenüber ebenso negativ verhalten wie Blutkörperchen fremder Tiere. Wie nämlich aus den vorangehenden Erörterungen hervorgeht, war auch aus den Versuchen von Ritz noch nicht erwiesen, ob die osmierten Blutkörperchen des Hammels nur in unspezifischer Weise die Hämolysine verankerten; da sich diese ja genau so verhalten könnten wie die Alkoholhammelblutkörperchen, deren scheinbare nicht spezifische Bindung wir durch die Komplementbindungsreaktion als spezifischen Vorgang erkannt

Versuch 3a.

10 ccm Hammelblut werden gewaschen und davon 5 ccm in 10 ccm Alkohol und 5 ccm in 7 ccm 1%igem Osmium, das mit 7 ccm NaCl verdünnt war, aufgeschwemmt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach zentrifugiert und mehrmals gewaschen.

I.	Hammelblut nativ ccm	+ Hämolytisches Immunserum ccm	+ Komplement ccm	Nach 1 Stunde bei 37° zu jedem Röhrchen je 1 ccm 5%ige, 3fach sensibilisierte Hammelblutkörperchen.	Resultat
	0,25	0,1	0,075		0
	0,25	0,05	0,075		0
	0,25	0,01	0,075		0
	0,25	0,005	0,075		0
	0,25	—	0,075		k
II.	Hammelblut mit Alkohol behandelt ccm	+ Hämolytisches Immunserum ccm	+ Komplement ccm		
	0,25	0,1	0,075		0
	0,25	0,05	0,075		0
	0,25	0,01	0,075		0
	0,25	0,005	0,075		0
	0,25	—	0,075		k
III.	Hammelblut mit Osmium behandelt ccm	+ Hämolytisches Immunserum ccm	+ Komplement ccm		
	0,25	0,1	0,075		k
	0,25	0,05	0,075		k
	0,25	0,01	0,075		k
	0,25	0,005	0,075		k
	0,25	—	0,075		k

hatten. Die Versuchsanordnung, die wir einzuschlagen hatten, war klar vorgezeichnet. Wir mußten osmierte Blutkörperchen des Hammels mit Immunserum behandeln und hierauf die Rückstände auf Komplementbindung untersuchen. Verschwand das Komplement, dann war die Bindung des Immunkörpers eine spezifische; verschwand es nicht, dann war es ein unspezifischer Vorgang. Als Vergleichskontrollen benützten wir stets intakte Blutkörperchen, sowie solche, die mit Alkohol behandelt waren, deren spezifische Bindung — wie bereits erwähnt — wir früher erwiesen hatten.

Aus dem Versuch 1 geht klar hervor, daß die Alkoholblutkörperchen ebenso wie die nativen Blutkörperchen — nach-

Versuch 3b.

Untersuchung der Abgüsse.

I.	Hammelblut nativ ccm	+	Hämolytisches Immunserum ccm	Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° werden nach Zentrifugieren der Blutkörperchen die Abgüsse mit 0,05 Komplement auf Immunkörper untersucht.	Resultat
	0,25		0,1		0
	0,25		0,05		0
	0,25		0,01		0
	0,25		0,005		0
	0,25		—		0
II.	Hammelblut mit Alkohol behandelt ccm	+	Hämolytisches Immunserum ccm		
	0,25		0,1		k
	0,25		0,05		k
	0,25		0,01		st
	0,25		0,005		w
	0,25		—		0
III.	Hammelblut mit Osmium behandelt ccm	+	Hämolytisches Immunserum ccm		
	0,25		0,1		k
	0,25		0,05		k
	0,25		0,01		0
	0,25		0,005		0
	0,25		—		0

dem sie mit dem Immunserum in Kontakt waren — in sehr starkem Maße befähigt sind, Komplement zu binden, wohingegen die osmierten Erythrocyten das Komplement völlig intakt lassen.

Die beiden vorangehenden Versuche (2 und 3) erweisen hinsichtlich der Komplementbindung einwandfrei dieselbe Tatsache und zeigen gleichzeitig, daß bezüglich der Immunkörperbindung zwischen Alkohol- und Osmiumblut eine Differenz eher zu ungunsten der Alkoholblutkörperchen zutage tritt. In dem folgenden Versuche wollten wir uns nochmals überzeugen, ob sich die mit Alkohol behandelten Blutkörperchen hinsichtlich der Immunkörperbindung ebenso verhalten wie die osmierten.

Es geht auch aus dem Versuch 4 hervor, daß hinsichtlich der Immunkörperbindung zwischen Alkohol- und Osmiumblutkörperchen eine Differenz nicht besteht. Daß die nativen

Versuch 4.

Hammelblutkörperchen werden in gleicher Weise wie in den früheren Versuchen in Alkohol und Osmium aufgeschwemmt und darauf 24 Stunden bei Zimmertemperatur gelassen, zentrifugiert und mehrmals gewaschen.

Röhrchen I: 1 ccm natives Hammelblut + 0,2 Immunserum + 4 ccm NaCl.

Röhrchen II: 1 ccm des mit Alkohol behandelten Hammelbluts + 0,2 ccm Immunserum + 4 ccm NaCl.

Röhrchen III: 1 ccm des mit Osmium behandelten Hammelbluts + 0,2 ccm Immunserum + 4 ccm NaCl.

Alle 3 Röhrchen bleiben 1 Stunde bei 37°, werden dann zentrifugiert und von den Abgüssen werden folgende Verdünnungen gemacht.

Abguß von Röhrchen I ccm	+ Komplement ccm	+ 5% Hammelblut ccm	Resultat
2,0	0,05	1	0
1,0	0,05	1	0
0,5	0,05	1	0
0,25	0,05	1	0
0,1	0,05	1	0
0,05	0,05	1	0
Abguß von Röhrchen II ccm	**+ Komplement ccm**	**+ 5% Hammelblut ccm**	
2,0	0,05	1	st
1,0	0,05	1	w
0,5	0,05	1	Sp
0,25	0,05	1	0
0,1	0,05	1	0
0,05	0,05	1	0
Abguß von Röhrchen III ccm	**+ Komplement ccm**	**+ 5% Hammelblut ccm**	
2,0	0,05	1	k
1,0	0,05	1	st
0,5	0,05	1	w
0,25	0,05	1	0
0,1	0,05	1	0
0,05	0,05	1	0

Blutkörperchen in dieser Hinsicht quantitativ stärker wirksam sind, wissen wir bereits aus früheren Versuchen.

Diese Versuche beweisen nun mit Sicherheit, daß die Bindung der osmierten und der mit Alkohol behandelten Blutkörperchen eine ganz verschiedene ist. Denn während wir bei den letzteren durch die Methode der Komplementbindung die

Spezifität dieses Vorgangs beweisen konnten, ist dies bei ersteren absolut nicht der Fall. Denn diese verhalten sich, obzwar sie den spezifischen Immunkörper in genau derselben Weise unwirksam machen, wie die mit Alkohol behandelten, dem Komplement gegenüber vollständig refraktär.

Abgesehen davon, daß unsere Versuche einen Beweis für die Wichtigkeit der spezifischen Gruppen in ihrer Beziehung zur Antigenität erbringen, geben sie uns eine Methode an, die uns ermöglicht, eine spezifische Bindung von einer unspezifischen Adsorption zu unterscheiden. Ob diese Verhältnisse allgemeine Gültigkeit haben, werden wir in weiteren Versuchen, die mit Bakterien angestellt wurden, zeigen.

Zur Frage der Bildung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung.

Von

S. Kostytschew.

(Aus dem zymotechnischen Laboratorium des Technologischen Instituts in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 8. April 1914.)

In ihrer „XIII. Mitteilung über zuckerfreie Gärungen" haben Neuberg und Kerb[1]) eine kritische Betrachtung verschiedener in meinen „Mitteilungen über Alkoholgärung" dargelegten experimentellen Ergebnisse und theoretischen Auseinandersetzungen geliefert. Da nun einige Tatsachen von den Verfassern meiner Meinung nach nicht richtig beurteilt worden sind, so bin ich genötigt, die Frage nach der Bildung und Bedeutung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung wiederum zu besprechen.

Von den theoretischen Einwänden von Neuberg und Kerb will ich nur die wichtigsten erwähnen. Es sind nämlich die beiden folgenden Punkte:

I. Die Verfasser behaupten, daß die in meinen Versuchen nach Zugabe von Zinkchlorid entstehenden Mengen von Acetaldehyd zu gering sind, um Schlußfolgerungen über die Rolle dieses Stoffes im Gärungsprozeß zu ziehen, da die von mir isolierten Aldehydmengen „sich um 0,6 bis 1,5 pro Mille, berechnet auf den angewandten Zucker, bewegen und nur in einem Falle 2,0 pro Mille erreichen"[2]).

Es sei beiläufig bemerkt, daß diese Berechnung nur in dem Falle akzeptiert werden könnte, wenn die Gesamtmenge des angewandten Zuckers in der Tat verarbeitet worden wäre. Dies ist aber durchaus nicht der Fall: die Versuche 11, 12 und 13 meiner IV. Mitteilung[3]), die

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. 58, 158, 1913.

[2]) C. Neuberg und J. Kerb, l. c. S. 159.

[3]) S. Kostytschew u. A. Scheloumow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 500, 1913.

unter denselben Verhältnissen ausgeführt sind wie diejenigen der III. Mitteilung, wo ich die Aldehydausbeuten ermittelte, zeigen, daß in Gegenwart von Chlorzink nur etwa ein Drittel der gesamten Zuckermenge durch Hefe zerlegt wird. Da nun bei diesen Verhältnissen bloß 45 bis 57% des durch Hefe angegriffenen Zuckers in die normalen Endprodukte der Gärung (CO_2 und Alkohol) übergehen, so ist es, mit Rücksicht auf die wahrscheinliche Rolle von Acetaldehyd bei der Gärung, vielleicht noch richtiger, denselben auf den gebildeten Alkohol zu berechnen. Es ergibt sich, daß etwa 1% des Alkohols durch Aldehyd ersetzt wird; eine immerhin geringe Zahl.

Es ist gegenwärtig die Ansicht noch immer vorherrschend, daß nur beträchtliche Ausbeuten an Produkten der biochemischen Reaktionen Beachtung verdienen. Solange man nur mit der Bestimmung der Gesamtbilanz biologisch wichtiger chemischer Vorgänge zu tun hatte, war diese Forderung vollkommen gerechtfertigt; anders verhält sich jedoch die Sache bei der Erforschung von Zwischenstufen! Es ist leicht einzusehen, daß verschiedene intermediäre Produkte nur in geringen Mengen auftreten können. In betreff von Acetaldehyd suchten dies auch Neuberg und Kerb selbst zu beweisen. Auf Grund verschiedener Erwägungen kommen sie zu dem Schluß, daß nach ihrem Schema der Acetaldehyd „stets nur in kleinen Mengen auftreten kann, in Übereinstimmung mit den tatsächlichen Verhältnissen[1])" In manchen Fällen wäre es in der Tat eine vergebliche Mühe, die Bildung beträchtlicher Mengen der Zwischenprodukte verschiedener biochemischer Reaktionen bewirken zu wollen. Bei derartigen Untersuchungen sind oft gerade diejenigen Stoffe beachtenswert, die nur in geringen Mengen entstehen; für die Beurteilung der Rolle dieser Produkte sind nicht die Ausbeuten von Belang, sondern verschiedene Regelmäßigkeiten der Bildung, die den theoretischen Forderungen entsprechen.

Letzteren Beweis bin ich allerdings noch schuldig geblieben, hoffe aber, auf Grund verschiedener Beobachtungen denselben schließlich zu erbringen. Jedenfalls ist die Tatsache beachtenswert, daß namentlich Zinkchlorid, das den Zuckerabbau durch Zymase wesentlich verändert[2]), zu gleicher Zeit auch eine ge-

---

[1]) Neuberg und Kerb, l. c. S. 161.

[2]) S. Kostytschew und A. Scheloumow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 493, 1913.

steigerte Aldehydbildung hervorruft. Nach kurzer Zeit wird durch direkte Aldehydbestimmungen dargetan werden, wie gewaltig die Aldehydbildung bei der Zuckergärung durch Chlorzink gesteigert wird.

Bei dieser Gelegenheit will ich folgenden Einwand von Neuberg und Kerb zurückweisen. Die Verfasser sprechen davon, daß ich die Riminische Reaktion für „quantitative Zwecke" verwertete[1]). Dies ist nicht richtig und könnte eine verkehrte Vorstellung von den bei meinen Untersuchungen benutzten Methoden geben. Als quantitative Bestimmung wird doch eine Methode bezeichnet, welche die absoluten oder mindestens die relativen Mengen der zu bestimmenden Substanz in Zahlen ergibt. Dies war in obigen Versuchen nicht der Fall; mein Zweck war bloß die Feststellung der Tatsache, daß die Aldehydbildung nicht nur durch Zinkchlorid, sondern auch durch andere lösliche Zinksalze hervorgerufen wird. Von den Mengen des hierbei entstehenden Aldehyds habe ich gar nicht gesprochen; ich notierte nur die Intensität der Riminischen Reaktion[2]). Diese vorläufige Untersuchung war also eine durchaus qualitative.

II. Meine Behauptung, daß es gelungen ist, durch Chlorzink zum erstenmal die Wirkung eines Fermentes in andere Bahnen zu lenken, halten Neuberg und Kerb[3]) für unzulässig, „da es sich hier einfach um eine Verschiebung der Schwellenwerte handelt", abgesehen davon, daß die Mengen von Acetaldehyd zu gering sind, um eine so weitgehende Schlußfolgerung zu gestatten.

Hier liegt vielleicht ein Mißverständnis vor. Meine obige Schlußfolgerung wird gewiß nicht durch Bildung geringer Aldehydmengen, sondern durch folgende Tatsache bekräftigt. Während bei Abwesenheit von Zinkchlorid die Zymasespaltung des Zuckers zu CO_2 und Alkohol so glatt quantitativ erfolgt, daß sie u. a. die Grundlage einer Methode der quantitativen Zuckerbestimmung bildet[4]), werden in Gegenwart ganz geringer Mengen von Zinkchlorid nur etwa 45 bis 55% des durch Dauerhefe zerlegten Zuckers zu Alkohol und CO_2 verarbeitet. Ich halte es für wohl berechtigt, von einer qualitativen Änderung des

---

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. 58, 166, 1913.

[2]) S. Kostytschew und A. Scheloumow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 498, 1913.

[3]) Neuberg und Kerb, l. c. S. 170.

[4]) B. Tollens im Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden 2, 141, 1910.

Gärungsvorganges in dem Falle zu sprechen, wo bloß die Hälfte des zerlegten Gärmaterials in die normalen Produkte übergeht. Daß aber meine Vorstellung von dem Wesen dieser Änderung mit der Neubergschen Ansicht in den Hauptzügen identisch ist, erhellt z. B. aus folgendem Zitate, das ich meiner IV. Mitteilung über Alkoholgärung entnehme.

„Es ist von vornherein sehr wahrscheinlich, daß die ‚qualitative Veränderung' der Gesamtheit der Fermentwirkungen bei der alkoholischen Gärung nur auf die Störung der Korrelation von verschiedenen einzelnen Phasen des Vorganges zurückzuführen ist: es wird ja gegenwärtig allgemein anerkannt, daß die Fermente nur die Geschwindigkeit der Reaktionen verändern. Von diesem Standpunkte aus wäre es kaum zulässig anzunehmen, daß die Gärungsfermente in Gegenwart von $ZnCl_2$ ihre Tätigkeit grundsätzlich verändern und den Zucker auf eine neue eigentümliche Weise zu spalten beginnen"[1]).

Diese Auseinandersetzung wurde von Neuberg und Kerb wahrscheinlich übersehen.

III. Nun will ich noch diejenigen von Neuberg und Kerb beschriebenen experimentellen Ergebnisse betrachten, die mit meinen Resultaten nicht im Einklange stehen. Der erste Widerspruch besteht darin, daß die Herkunft von Acetaldehyd aus Zucker, der Meinung von Neuberg und Kerb nach, nicht bewiesen sei. Die Verfasser sind vielmehr geneigt anzunehmen, daß Acetaldehyd aus anderweitigen Stoffen entsteht. Der zweite Widerspruch betrifft die Methode der quantitativen Alkoholbestimmung in Gegenwart von Aldehyd.

a) Bereits früher hatten Neuberg und Kerb[2]) die Ansicht erörtert, daß Acetaldehyd nicht aus Zucker entsteht, und suchten dies durch Versuche zu beweisen, in denen bei der Selbstgärung von Dauerhefe (also ohne Zuckerzugabe) in Gegenwart von Zinkchlorid Aldehydbildung erfolgte. In der letzten Mitteilung[3]) wird noch ein Versuch mit Macerationshefensaft beschrieben, der zu eben demselben Resultat führte.

Nehmen wir der Einfachheit wegen vorläufig an, daß bei jeder Versuchsanordnung in der Tat eine bestimmte Aldehydmenge aus Nichtzuckerstoffen (z. B. aus Aminosäuren) entsteht.

---

[1]) S. Kostytschew und A. Scheloumow, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 505, 1913.

[2]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **43**, 494, 1912.

[3]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 162, 1913.

Zur Lösung der Frage, ob außerdem auch Zucker als Material zur Aldehydbildung dienen kann, müssen in diesem Falle gleichzeitige Versuche mit und ohne Zuckergabe ausgeführt werden. Derartige Versuche habe ich auch tatsächlich beschrieben[1]), da aber die erhaltenen Resultate in der kritischen Abhandlung von Neuberg und Kerb gar nicht erwähnt wurden, so will ich dieselben hier kurz zusammenfassen.

Je 20 g Dauerhefe und 0,7 g $ZnCl_2$ lieferten bei Zimmertemperatur folgende Ausbeuten an Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon in Milligrammen:

I.	A. Selbstgärung	7,4
	B. Zuckergärung	83,6
II.	A. Selbstgärung	5,8
	B. Zuckergärung	88,1
III.	A. Selbstgärung in Wasser	16,7
	B. Selbstgärung in 10%igem Alkohol	16,9
	C. Zuckergärung	60,7.

Macerationssaft. 2 Portionen zu je 35 ccm Saft und 0,12 g $ZnCl_2$ bei Zimmertemperatur.

A. Ohne Zucker	—
B. Mit Zucker	24,1 mg.

Die Zuckergabe bildete den einzigen Unterschied zwischen „Selbstgärung" und „Zuckergärung"; sonst waren alle Verhältnisse genau die gleichen. Um ihre Ansicht von der Herkunft des Acetaldehyds aufrechtzuerhalten, müssen also Neuberg und Kerb Beweise dafür liefern, daß die gewaltige Mehrproduktion von Aldehyd in Zuckerportionen nicht auf eine Bildung von Aldehyd aus Zucker zurückzuführen ist.

An und für sich sind andere Möglichkeiten der Aldehydbildung wohl denkbar, wie ich es bereits früher betonte[2]). So hat Neubauer[3]) dargetan, daß α-Ketosäuren aus α-Aminosäuren entstehen könnten. Aus eben diesem Grunde halte ich sämtliche Beweisführungen zugunsten der Bedeutung von Brenztraubensäure am Vorgange der Zuckervergärung nicht für ausschlaggebend, solange die Bildung dieser Säure aus Zucker nicht nachgewiesen ist. Infolgedessen habe ich für meine Ver-

[1]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 97 bis 101, 1913.

[2]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 99, 1913.

[3]) O. Neubauer und Fromherz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 348, 1911.

suche Verhältnisse gewählt, bei denen die Selbstgärung und die Autolyse eine geringe Rolle spielen. Die bei anderen Verhältnissen ausgeführten Versuche können also meinen Ergebnissen nicht widersprechen; es ist z. B. wohl möglich, daß die Autolyse beträchtlicher Hefemengen bei Brutschranktemperatur eine nicht zu unterschätzende Aldehydbildung zur Folge haben kann.

Auch in diesem Falle könnte jedoch die erhaltene Aldehydausbeute ganz oder teilweise aus Zucker hervorgehen. Nach den Untersuchungen von E. Salkowski[1]) findet bei der Hefenautolyse eine bedeutende Glykogenverzuckerung statt. Auf Grund dieser Tatsache halte ich es für wohl berechtigt, die Selbstgärung mit E. Buchner[2]) als einen selbständigen fermentativen Vorgang zu betrachten und von anderen bei der Autolyse stattfindenden Spaltungen zu unterscheiden. Von diesem Standpunkte aus ist also die Selbstgärung ihrem Wesen nach eine richtige Alkoholgärung, bei der in Gegenwart von Chlorzink Acetaldehyd entsteht[3]).

Um diese Ansicht zu widerlegen, vertreten Neuberg und Kerb einen Standpunkt, der mir nicht haltbar erscheint. Die Verfasser haben sich zur Aufgabe gestellt, nachzuweisen, daß der bei Hefeautolyse gebildete Zucker durch Zymase nicht angegriffen, die Selbstgärung aber durch Temperatursteigerung nicht stimuliert wird[4]).

Nach 5tägiger Hefeautolyse in Gegenwart von Toluol haben Neuberg und Kerb Traubenzucker in der Lösung aufgefunden und betrachten dies als eine Bestätigung ihrer Ansicht; „denn die Menge präformierter Kohlenhydrate der Hefe ist doch relativ klein im Vergleich zur Gärkraft des betreffenden Hefequantums, und man sollte erwarten, daß die Zymase, die doch große Mengen zugesetzten Zuckers vergärt, jene kleine Quantität Zucker umsetzt, die durch Selbstverzuckerung entsteht. Einschlägige Versuche lehren aber, daß dies keineswegs der Fall ist“[5]).

---

[1]) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**, 506, 1889.

[2]) E. Buchner, Zymasegärung **1913**, 92.

[3]) Auch der Macerationssaft nach v. Lebedew zeigt immer eine deutliche Selbstgärung. Vgl. M. Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 71, 1914.

[4]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 165, 1913.

[5]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 163, 1913.

Hierbei wird jedoch dem Umstande nicht Rechnung getragen, daß bei Autolyse von Dauerhefe im Brutschrank die Zymase bekanntlich schon nach etwa 2 bis 3 Tagen vollkommen zerstört ist; der nach Ablauf dieser Zeit durch hydrolytische Spaltungen gebildete Zucker würde selbstverständlich nicht angegriffen. Infolgedessen können obige Versuche nicht eine Bestätigung der Annahme von Neuberg und Kerb liefern.

Es ist vielmehr von vornherein einleuchtend, daß die Selbstgärung und die Autolyse bei Brutschranktemperatur mit größerer Geschwindigkeit als bei Zimmertemperatur verlaufen müssen, da sämtliche Fermentwirkungen bekanntlich durch Temperatursteigerung innerhalb dieser Grenzen befördert werden. Folgende Beobachtungen über die CO_2-Produktion bei der Selbstgärung von Dauerhefe zeigen in der Tat, daß dieser Vorgang mit einer viel größeren Energie bei 34° als bei Zimmertemperatur (15 bis 16°) verläuft. Zu diesen Versuchen wurden Gärkölbchen mit Meißlschem Verschluß verwendet.

4 Gärkolben mit je 10 g trockener Hefe nach v. Lebedew, 25 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol[1]).

Nr.	Temperatur ° C	CO_2 in Gramm nach 25 Std.	50 Std.
1	34	0,26	0,33
2	15—16	0,05	0,06
3	34	0,29	0,35
4	15—16	0,06	0,09

2 Gärkolben mit je 10 g Hefanol, 25 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol.

Nr.	Temperatur ° C	CO_2 in Gramm nach 25 Std.	50 Std.
1	34	0,18	0,32
2	15—16	0,05	0,08

Es ist einleuchtend, daß auch die Bedingungen für die Aldehydbildung in beiden Fällen nicht die gleichen sind. In einzelnen Fällen

[1]) Für die unter Zusatz von antiseptischen Mitteln ausgeführten Versuche müssen selbstverständlich Dauerhefen oder Hefesaft verwendet werden, da lebende Hefe nach Vergiftung nur ganz geringe Zuckermengen zerlegen kann (vgl. „Zymasegärung" S. 175 und 180).

könnte hierbei wohl die größere Energie der Zuckerspaltung mit einer geringeren Aldehydproduktion zusammenhängen; durch Einwirkung von Chlorzink wird ja überhaupt die Energie der Gärung bedeutend abgeschwächt, die Aldehydbildung aber gleichzeitig gesteigert.

b) In methodischer Hinsicht weisen Neuberg und Kerb[1]) darauf hin, daß es ihnen nicht gelungen ist, nach dem von mir angegebenen Verfahren[2]) Alkohol und Aldehyd zu trennen.

Aus diesem Grunde scheinen Neuberg und Kerb überhaupt zu bezweifeln, daß durch unsere Versuche die Reduktion von Acetaldehyd zu Äthylalkohol dargetan wurde. Sollten jedoch gar sämtliche in Gegenwart von Acetaldehyd ausgeführten quantitativen Alkoholbestimmungen nicht in Betracht gezogen werden, so würde dies unsere Schlußfolgerung nicht entkräften können, da wir den gebildeten Alkohol in Substanz isoliert haben. Der Alkohol wurde durch entwässerte Pottasche ausgesalzen und durch gebranntes Calciumoxyd getrocknet[3]). Die Ausbeute betrug 1,53 g, während die Alkoholbestimmungen in Kontrollportionen nur eine Gesamtmenge von 0,657 g Alkohol ergaben. Der aus Aldehyd gebildete Alkohol wurde durch Überführung in p-Nitrobenzoesäureäthylester identifiziert[4]).

Weiterhin behaupten Neuberg und Kerb, daß bei Anwendung der Nicloux schen Methode der Alkoholbestimmung eine Abscheidung von Acetaldehyd überhaupt nicht nötig sei[5]). Nach meinen früheren Erfahrungen ist jedoch diese Behauptung irrig.

Alle diese Bemerkungen haben mich veranlaßt, die Methoden der Alkoholbestimmung in Gegenwart von Acetaldehyd einer eingehenden Prüfung zu unterwerfen. Nachstehend sind die Resultate dieser Untersuchung mitgeteilt.

Von den zahlreichen einschlägigen Versuchen soll hier nur ein Teil wiedergegeben werden. Zu diesen Bestimmungen wurden folgende Lösungen verwendet:

A. Eine mit Hilfe einer kalibrierten Bürette hergestellte Lösung von 3 ccm Alkohol in 1 l Wasser (eine 0,238%ige Alkohollösung). Die Titration nach Nicloux[6]) ergab in der Tat, daß

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 167, 1913.

[2]) S. Kostytschew und E. Hübbenet, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 363, 1912.

[3]) E. Erlenmeyer, Annal. d. Chem. **160**, 249, 1871.

[4]) S. Kostytschew und E. Hübbenet, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 367, 1912.

[5]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 168, 1913.

[6]) M. Nicloux, Bull. de la Soc. Chim. **35**, 330, 1906.

5 ccm der mit gleichem Volumen Wasser versetzten Lösung genau 1,5 ccm Kaliumbichromatlösung verbrauchen.

B. Eine etwa $1^0/_0$ige Lösung von frisch dargestelltem reinen Acetaldehyd (Siedepunkt 21^0) im destillierten Wasser.

Bei dieser Gelegenheit sei bemerkt, daß man den reinen Acetaldehyd leichter aus einem guten Präparat von Paraldehyd darstellen kann, als aus käuflichen Präparaten von „reinstem" Acetaldehyd, selbst wenn diese mit Angabe des Siedepunktes versehen sind und zu übermäßig hohen Preisen geliefert werden.

Zunächst will ich zeigen, daß die Niclouxsche Methode der Alkoholbestimmung in Gegenwart von Acetaldehyd unrichtige Resultate ergibt.

1. 5 ccm Lösung B wurden mit ein paar Tropfen Kaliumbichromatlösung und 5 ccm Schwefelsäure versetzt und erhitzt. Es erfolgte eine Braunfärbung infolge Verharzung von Acetaldehyd.

2. 10 ccm Lösung B und 10 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung wurden bei der Behandlung nach Nicloux ebenfalls sofort braun gefärbt.

3. 10 ccm Lösung B und 30 ccm Wasser.

Keine Verharzung. 5 ccm dieser Mischung verbrauchten 2,4 ccm Bichromatlösung.

4. 10 ccm Lösung B und 90 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung verbrauchten 0,75 ccm Bichromatlösung.

Diese Bestimmungen zeigen also, daß Acetaldehyd bei der Titration nach Nicloux oxydiert wird. Folgende Versuche beweisen, daß die Oxydation von Acetaldehyd auch in Gegenwart von Alkohol zustande kommt.

5. 25 ccm Lösung A und 25 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung verbrauchten 1,5 ccm Bichromatlösung.

6. 25 ccm Lösung A und 25 ccm Lösung B.

Nach Zusatz von ein paar Tropfen Bichromatlösung und Schwefelsäure erfolgte Verharzung des Aldehyds. Die Ausführung der Alkoholbestimmung ist also überhaupt nicht möglich.

7. 25 ccm Lösung A, 5 ccm Lösung B und 20 ccm Wasser.

Keine Verharzung. 5 ccm der Mischung verbrauchten 2,1 ccm Bichromatlösung.

8. 25 ccm Lösung A, 2,5 ccm Lösung B und 22,5 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung verbrauchten 1,8 ccm Bichromatlösung.

9. 50 ccm Lösung A, 2,5 ccm Lösung B und 47,5 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung verbrauchten 1,65 ccm Bichromatlösung.

10. 25 ccm Lösung A, 0,5 ccm Lösung B und 24,5 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung verbrauchten 1,55 ccm Bichromatlösung.

Entgegen der Meinung von Neuberg und Kerb ist die Alkoholbestimmung nach Nicloux in Gegenwart von Acetaldehyd unzulässig, falls die Aldehydkonzentration 0,01% übersteigt. Die ohne Abscheidung von Aldehyd ausgeführten Alkoholbestimmungen sind ungenau.

Die Berechnung der bei der Titration von Alkohol nach Nicloux verbrauchten Sauerstoffmenge (1 Mol. $K_2Cr_2O_7$ liefert 3 Atome Sauerstoff) ergibt in der Tat, daß der Alkohol zu Essigsäure oxydiert wird. Ein geringer Überschuß von Bichromat ist notwendig, um den Farbenumschlag hervorzurufen.

Nun fragt es sich, welche Methode der Aldehydabscheidung bei den quantitativen Alkoholbestimmungen Beachtung verdient.

v. Lebedew[1]) destilliert die Lösung in Gegenwart Fehlingscher Lösung und wiederholt diese Operation bis zum Verschwinden der Aldehydreaktionen im Destillat. Dieses Verfahren erwies sich jedoch als unzureichend.

11. 50 ccm Lösung B wurden mit 100 ccm Fehlingscher Lösung versetzt, 25 Minuten am Rückflußkühler gekocht, dann destilliert. Das Destillat riecht stark nach Acetaldehyd und hat außerdem einen eigentümlichen esterartigen[2]) Geruch; es liefert eine äußerst starke Reaktion von Rimini und färbt sich tiefrot nach Zusatz von fuchsinschwefliger Säure. Der

[1]) A. v. Lebedew und N. Griaznow, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 3266, 1912.

[2]) Eine wirkliche Esterbildung ist bei diesen Verhältnissen gewiß kaum denkbar.

filtrierte Rückstand von der Destillation enthielt eine sehr große Menge von nicht verbrauchtem Kupferoxyd: nach Zusatz von Traubenzucker bildete sich beim Erhitzen ein reichlicher Niederschlag von Kupferoxydul.

12. 50 ccm Lösung B wurden mit 200 ccm Fehlingscher Lösung $1^1/_2$ Stunden am Rückflußkühler im wallenden Sieden erhalten, dann destilliert. Das Destillat hat wiederum denselben esterartigen Geruch; es gibt nicht die Riminische Reaktion, färbt sich aber intensiv rot nach Zusatz von fuchsinschwefliger Säure.

Die v. Lebedewsche Methode ist also nicht zu empfehlen, da hierbei die Bildung von Nebenprodukten kaum zu vermeiden ist. Auch Neuberg und Kerb[1]) berichteten darüber, daß es ihnen nicht gelungen ist, den Aldehyd nach dem Lebedewschen Verfahren zu zerstören.

Außerdem haben v. Lebedew und Griaznow den Alkohol nicht isoliert und quantitative Alkoholbestimmungen mit Hilfe der Duclaneschen Pipette ausgeführt, die selbst mit reinen Alkohollösungen nur annähernd richtige Resultate liefert. In Gegenwart anderweitiger Stoffe wird die Genauigkeit der Bestimmung noch geringer, infolge Änderung der Oberflächenspannung der Lösung. Das von v. Lebedew und Griaznow für die Zuckergärung erhaltene Resultat ist auch bestimmt fehlerhaft[2]).

Neuberg und Kerb[3]) haben den Aldehyd durch 8stündiges Kochen am Rückflußkühler mit Silberoxyd zerstört. In meinen Versuchen wurde der Aldehyd bei Anwendung geringer Menge der Flüssigkeit in der Tat bereits nach $1^1/_2$ stündigem Erhitzen mit Silberoxyd ohne Bildung von Nebenprodukten oxydiert; diese Methode ist aber mit einem nicht zu unterschätzenden Alkoholverlust verbunden.

13. a) 25 ccm Lösung A wurden mit 25 ccm Wasser versetzt. 5 ccm der Mischung verbrauchten 1,5 ccm Bichromatlösung.

b) 25 ccm Lösung A wurden mit 25 ccm Lösung B und 25 ccm Wasser versetzt, die Mischung mit 6 g von frisch gefälltem Silberoxyd $1^1/_2$ Stunden am Rückflußkühler gekocht,

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **53**, 414, 1913.

[2]) S. Kostytschew und E. Hübbenet, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 408, 1913.

[3]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **53**, 414, 1913.

dann destilliert. Das Destillat (50 ccm) liefert nicht die Reaktion von Rimini; mit fuchsinschwefliger Säure entsteht erst nach längerem Stehen eine schwache Rosafärbung. Die Alkoholbestimmung ergab folgendes Resultat:

5 ccm verbrauchten 1,3 ccm Bichromatlösung.

Alkoholverlust 0,159 g per Liter Lösung.

Das Destillat wurde in nachstehend beschriebener Weise mit Bisulfit behandelt; die Alkoholzahl blieb hiernach unverändert.

Das Verfahren von Neuberg und Kerb kann wohl für präparative Zwecke benutzt werden; die Genauigkeit der quantitativen Alkoholbestimmungen wird jedoch durch Anwendung dieser Methode der Aldehydabtrennung etwas beeinträchtigt. Auch das lange Kochen mit Silberoxyd ist zeitraubend.

Ebenso zeitraubend ist aber die wiederholte Destillation mit Bisulfit, wie ich sie früher verwendet habe. Sind beträchtliche Aldehydmengen in einer Lösung enthalten, so gelingt es in der Tat nicht, den Aldehyd bei der ersten Destillation total zu entfernen.

Trotzdem gelang es uns immer, durch wiederholte Destillationen eine vollkommene Abscheidung von Aldehyd zu erzielen. Dies ist ersichtlich vor allem aus den Resultaten der Alkoholbestimmungen in denjenigen Versuchen, wo eine Aldehydreduktion nicht stattgefunden hat[1]). Die Kontroll- und Versuchsportionen lieferten in diesem Falle die gleichen Alkoholmengen. Ich halte es jedoch für überflüssig, die Brauchbarkeit dieser alten Methode durch Experimente zu bekräftigen, da die nachstehend beschriebene neue Modifikation doch entschieden vorzuziehen ist.

Daß der Acetaldehyd in Form von Bisulfitverbindung vollkommen gebunden wird, ist kaum zu bezweifeln, da gerade auf dieser Tatsache die zuverlässigsten Methoden der quantitativen Aldehydbestimmung fußen. Das Auftreten von Aldehyd im Destillat kann also nur davon herrühren, daß ein Teil der Bisulfitverbindung beim Kochen zerlegt wird. Infolgedessen habe ich versucht, die Lösung bei vermindertem Druck unter schwachem Erwärmen und Kühlung der Vorlage zu destillieren. Dieses Verfahren ergab in der Tat ganz befriedigende Resultate: der Aldehyd wird auf einmal vollkommen und ohne Alkoholverlust

[1]) S. Kostytschew und E. Hübbenet, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 371, 1912.

entfernt; außerdem ist die ganze Operation in kurzer Zeit ausführbar, unter Voraussetzung, daß für die nachfolgende Alkoholbestimmung die Methode von Nicloux oder die noch genauere Methode von Barendrecht[1]) benutzt wird. In diesem Falle ist es nämlich vollkommen genügend, 50 ccm der verdünnten Alkohollösung, wie sie für die genannten Titriermethoden verwendet wird, für die Reinigung zu nehmen. Diese wird nun folgendermaßen ausgeführt: 50 ccm der sehr verdünnten aldehydhaltigen Alkohollösung werden mit etwa 10 ccm konzentrierter $NaHSO_3$-Lösung (käufliche Bisulfitlösung von Kahlbaum) versetzt, etwa 15 bis 20 Minuten ruhig stehen gelassen, dann bei einem Druck von etwa 15 mm und einer Temperatur des Wasserbades von 30 bis 35° destilliert. Die Vorlage muß mit Eis gekühlt werden und der Vorstoß des (möglichst langen) Kühlers innerhalb des gekühlten Teiles der Vorlage sich befinden. Bei Nichtbeachtung dieser Vorsichtsmaßregel sind kleine Alkoholverluste nicht immer ausgeschlossen. Um die Gummischläuche zu schonen, versetzt man die Vorlage von vornherein mit einer geringen Menge Natronlauge. Die Destillation kann unterbrochen werden, nachdem etwa 20 ccm in die Vorlage übergegangen sind. Man versetzt das Destillat mit etwa 40 ccm destilliertem Wasser, vergewissert sich davon, daß die Flüssigkeit alkalische Reaktion aufweist (ist dies nicht der Fall, so setzt man wiederum Natronlauge hinzu) und rektifiziert dann beim gewöhnlichen Druck, wobei man als Vorlage einen Meßkolben von 50 ccm Inhalt verwendet, den man schließlich mit destilliertem Wasser zur Marke auffüllt.

Folgende Prüfungen beweisen, daß die Methode ganz zuverlässig ist. Auch in dem Falle, wenn die Aldehydkonzentration bedeutend größer ist als die Alkoholkonzentration, wird die Trennung glatt ausgeführt.

14. 50 ccm 1%iger Aldehydlösung B wurden mit 10 ccm Bisulfitlösung versetzt, im Vakuum destilliert, dann mit Natronlauge rektifiziert.

Das Destillat gibt nicht die Reaktion von Rimini. Mit fuchsinschwefliger Säure selbst nach längerem Stehen keine Spur der Rotfärbung.

---

[1]) H. P. Barendrecht, Zeitschr. f. analyt. Chem. 52, 167, 1913.

15. a) 50 ccm Lösung A und 50 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung verbrauchten 1,5 ccm Bichromatlösung.

b) 50 ccm Lösung A und 50 ccm Lösung B.

Die Alkoholbestimmung nach Nicloux ist nicht möglich wegen sofortiger Verharzung von Aldehyd. 50 ccm dieser Mischung wurden mit 10 ccm Bisulfitlösung versetzt, im Vakuum destilliert, mit Natronlauge rektifiziert und das Destillat auf 50 ccm aufgefüllt.

Das Destillat gibt nicht die geringste Spur der Aldehydreaktionen.

5 ccm Destillat verbrauchten 1,5 ccm Bichromatlösung.

16. 50 ccm Lösung A, 10 ccm Lösung B und 40 ccm Wasser.

5 ccm dieser Mischung verbrauchten 2,1 ccm Bichromatlösung.

50 ccm der Mischung wurden mit 5 ccm Bisulfitlösung versetzt, im Vakuum destilliert, mit Natronlauge rektifiziert und das Destillat auf 50 ccm aufgefüllt.

Das Destillat gibt keine Spur der Aldehydreaktionen.

5 ccm Destillat verbrauchten 1,5 ccm Bichromatlösung.

17. 50 ccm Lösung A, 10 ccm Lösung B und 40 ccm Wasser.

Dieselbe Bearbeitung wie im vorstehenden Versuche, doch ohne Kühlung der Vorlage. Temperatur des Wasserbades 25 bis 28°.

Das Destillat gibt keine Spur der Aldehydreaktionen.

5 ccm Destillat verbrauchten 1,45 ccm Bichromatlösung.

Diese Methode habe ich bei meinen neueren Untersuchungen verwendet.

Die minder wichtigen Einwände von Neuberg und Kerb will ich hier nicht beantworten, da ein Ausgleich dieser Differenzen hoffentlich bei weiteren Untersuchungen allmählich herbeigeführt wird.

Über die Rolle des Acetaldehyds bei der Alkoholgärung.

Bemerkung zur vorstehenden Mitteilung von S. Kostytschew.

Von

C. Neuberg und **J. Kerb.**

In den früheren Mitteilungen[1]) haben wir gegen einige Behauptungen von Kostytschew über die Bildung und Bedeutung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung Einwände erhoben. Der Autor versucht dieselben in der voranstehenden Mitteilung zu widerlegen; wir können jedoch nicht finden, daß unsere Bedenken durch die erneuten Darlegungen von Kostytschew zerstreut worden sind. Im Einverständnis mit Herrn Kostytschew bringen wir unsere Ausführungen zur leichteren Information der Leser im unmittelbaren Anschluß an seine Veröffentlichung.

Punkt I:

Wir haben früher aus Kostytschews eigenen Zahlen berechnet, daß die Zunahme an Aldehyd, bei Vergärung des Zuckers in Gegenwart von Chlorzink, ad maximum 0,2% betrage, und uns schien diese Menge zu gering, um in ihr einen Beweis für den Verlauf der gesamten Zuckergärung über die Stufe des Acetaldehyds zu erblicken. Bei einer anderen Art der Berechnung, über deren Zulässigkeit man sehr streiten kann, kommt Kostytschew zu einem Maximalwert für den Acetaldehyd, den er zu 1% des entstandenen Äthylalkohols beziffert und jetzt selbst für „eine immerhin geringe Zahl" erklärt.

Kostytschew will neuerdings nicht in den quantitativen Verhältnissen, sondern in der regelmäßigen Bildung[2])

[1]) C. Neuberg u. J. Kerb, diese Zeitschr. **43**, 494, 1912; **58**, 158, 1913.

[2]) In einer Arbeit aus Palladins Institut ist jüngst S. Lvoff (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **3**, 311, 1913) zu dem Schluß gekommen, daß entgegen Kostytschews Angaben die Bildung von Acetaldehyd bei der Vergärung von Zucker zumeist nicht nachgewiesen werden kann, auch nicht nach Zusatz von Methylenblau, das nach K. die Aldehydbildung stark steigern soll.

kleiner Mengen Acetaldehyds ein Hauptmoment für sein Auftreten beim Zuckerabbau erblicken.

Wir wollen gar nicht in eine Diskussion seiner theoretischen Anschauungen über die Anhäufung von Zwischenprodukten eintreten, sondern nur erneut darauf hinweisen, daß vor Jahren Trillat[1]) in einer Reihe von Arbeiten die sekundäre Bildung von Acetaldehyd bei der Digestion von Hefe mit fertigem Äthylalkohol beschrieben hat. Auf diese Tatsachen, die eng mit den Angaben Kostytschews zusammenhängen, hat letzterer keine Rücksicht genommen.

Zugleich verwahrt sich Kostytschew gegen unsere frühere Behauptung, daß er die Riminische Reaktion zu quantitativen Zwecken benutzt habe. Der Passus in seiner früheren Arbeit[2]) lautet:

„Die Reaktion von Rimini erlaubt bei Anwendung gleicher Mengen von Destillat, Nitroprussidnatriumlösung und Diäthylaminlösung die Aldehydausbeuten nach der Intensität der entstandenen Färbung annähernd zu vergleichen."

Jeder unbefangene Leser würde mit uns wohl zunächst annehmen, daß es sich hier um die Prinzipien einer colorimetrischen Methode handelt und quantitative Ermittelungen angestrebt werden. Solche quantitativen Bestimmungen sind aber wegen der von uns[3]) nachgewiesenen Fehlerquellen unstatthaft.

Punkt II:

Wir hatten früher gegen die Behauptung Kostytschews, daß Chlorzink die Wirkung der Zymase in andere Bahnen lenke, das Bedenken geäußert, daß es sich einfach um eine Verschiebung der Schwellenwerte, nicht aber um eine veränderte Reaktionsrichtung handle. Wir glauben den Ausführungen Kostytschews entnehmen zu sollen, daß er tatsächlich unsern Standpunkt teilt und verweisen auf seine eigenen Darlegungen: „Von diesem Standpunkte aus wäre es kaum zulässig, anzu-

[1]) A. Trillat und Sauton, Compt. rend. de l'Acad. Mai 1908; Ann. de l'Inst. Pasteur 22, 1908; 24, 1910 u. a. a. O.

[2]) S. Kostytschew nnd A. Scheloumoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 497, 1913.

[3]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. 43, 498, 1912; 50, 500, 1913; 58, 166, 1913.

nehmen, daß die Gärungsfermente in Gegenwart von $ZnCl_2$ ihre Tätigkeit grundsätzlich verändern und den Zucker auf eine neue eigentümliche Weise zu spalten beginnen."

Allerdings will es uns scheinen, daß dieses Zitat[1]) die behauptete qualitative Veränderung des biochemischen Gärungsverlaufes implizite zurücknimmt.

Der Umstand, daß nach Kostytschew bei Gegenwart von Chlorzink rund 50% des von Dauerhefe angegriffenen Zuckers nicht in Form ven Alkohol und Kohlensäure erscheinen, kann unseres Dafürhaltens solange nicht mit der Frage nach den intermediären Abbauprodukten in Zusammenhang gebracht werden, als der Verbleib dieser 50% Zucker nicht aufgeklärt ist; denn es wäre ja denkbar, daß sie durch Reversion oder Veresterung u. dergl. der weiteren Einwirkung der zerlegenden Fermente entzogen würden.

Punkt III:

a) Wir haben nie behauptet, daß der Acetaldehyd ausschließlich anderen Quellen als dem Zucker entstammt, sondern nur auf die Ergebnisse unserer Versuche und die entsprechenden Angaben anderer Autoren (Trillat, Ashdown und Hewitt) verwiesen.

„Gewaltige Mehrproduktion" in den mit Chlorzink versetzten Proben können wir auch der neuen Tabelle Kostytschews nicht entnehmen. Diese gibt die Daten von Versuchen wieder, die er, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 97 und 98, beschrieben hat. Wir können nur wiederum konstatieren, daß im günstigsten Falle 0,022 g Acetaldehyd aus 20 g Zucker erhalten worden sind!

Wir kommen nun zu Kostytschews Behauptungen über die Beziehungen der sogenannten Selbstgärung zur normalen Gärung. Unter Berufung auf Buchner (Zymasegärung S. 92), der Glykogenverzuckerung und Vergärung in Hefepreßsaft als enzymatische Prozesse kennzeichnet, behauptet Kostytschew früher wie jetzt, daß die Selbstgärung ihrem Wesen nach eine gewöhnliche Alkoholgärung ist. Diese Anschauung haben wir schon früher bekämpfen müssen, namentlich für die Fälle, wo die Selbstgärung mit einer Autolyse einhergeht. Wir konnten zeigen, daß bei einer richtigen Autolyse die durch Glykogenverzuckerung gebildete Glucose nicht vergoren wird. Ko-

[1]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 506, 1913.

stytschew ist nun der Meinung, daß wir die in 2 bis 3 Tagen während der Autolyse sich vollziehende Zerstörung der Zymase nicht berücksichtigt hätten, und daß der von uns aus den Autolysaten isolierte Zucker jenes Quantum darstelle, das sich erst nach vollendeter Vernichtung der Zymase angehäuft habe. Diese Auffassung scheint uns nicht zutreffend. Denn wir verfügen über Versuche[1]) betreffs des Verhaltens von Traubenzucker, der bei Anstellung der Autolyse in freier Form zugefügt war. Dieser von vornherein zugesetzte Zucker wird bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank nicht oder nur spurenweise vergoren. Unsere Angaben beziehen sich auf Reinzuchthefen und hinreichende Antisepsis durch Anwendung genügender Mengen Toluol und Chloroform. Wir möchten bezweifeln, ob eine desinfizierende Kraft des Toluols in den von Kostytschew angeführten Versuchen (vgl. z. B. S. 243) zur Geltung kommt. Hier verwendet der Autor 0,5 ccm Toluol auf ein Gemisch von 10 g käuflicher Trockenhefe und 25 ccm Wasser. Abgesehen davon, daß die Trockenhefe nach unseren Befunden[2]) nicht steril ist, kann man sich folgendes Bild von der überhaupt möglichen Desinfektionskraft jener Toluolmenge machen. Das erhaltene Magma entspricht nämlich in seinen Volumen- und Gewichtsverhältnissen etwa dem Ansatz, den man beim Einrühren von 0,5 ccm Toluol in einen Klumpen von 33 g Preßhefe erhält!

Wir wollen schließlich bemerken, daß jüngst auch Palladin[3]) unserer Auffassung beipflichtet, daß Selbstgärung und normale alkoholische Gärung nicht identifiziert werden dürfen.

b) In methodischer Hinsicht haben wir früher Bedenken gegen die Genauigkeit der von Kostytschew angegebenen Zahlen für Alkohol und Aldehyd geäußert.

Sein damals benütztes Verfahren hat die quantitative Abtrennung des Aldehyds zur Voraussetzung. In Übereinstimmung mit v. Lebedew[4]) hatten wir uns trotz zahlreicher Versuche

[1]) Sie werden später in anderem Zusammenhange mitgeteilt werden.

[2]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. **62**, 492, 1914.

[3]) W. Palladin, N. Gromoff und N. N. Monteverde, diese Zeitschr. **62**, 137, 1914.

[4]) A. v. Lebedew und N. Griaznow, Ber. **45**, 3263, 1912.

nicht davon überzeugen können, daß das von Kostytschew benutzte Verfahren der Destillation mit Bisulfit eine quantitative Scheidung von Aldehyd und Alkohol gestattet. Kostytschew scheint inzwischen selber unsere Einwände berechtigt gefunden zu haben, da er nun (s. S. 249) eine neue Methode (Destillation über Bisulfit im Vakuum) empfiehlt; uns dieser zu bedienen, haben wir selbstverständlich noch keine Gelegenheit gehabt.

Wohl mit Unrecht und versehentlich wendet sich Kostytschew gegen unsere Angabe, daß man unter den hier in Betracht kommenden Bedingungen, d.h. in sehr verdünnten Lösungen, den Alkohol nach Nicloux ohne vorherige Zerstörung des Aldehyds bestimmen könnte. Da man bekanntlich bei der Nicloux-Methode[1]) nur ad maximum in einer Konzentration von 2 ‰ Alkohol arbeiten darf (wir arbeiten sogar stets mit einer Konzentration von höchstens 1 ‰, die schärfere Endreaktionen liefert), so ergibt sich z. B. aus dem in dieser Zeitschrift Bd. 58, S. 169 von uns mitgeteilten Versuch A, daß nur 0,05 g Acetaldehyd auf rund 0,5 g Äthylalkohol vorhanden gewesen sind.

Da unsere Alkoholkonzentration, wie gesagt, nicht ganz 1 ‰ gewesen ist, so war dementsprechend die Aldehydkonzentration 0,1 ‰, also von derselben Größenordnung, die Kostytschew selbst für zulässig erklärt. Hier kämpft also der Autor gegen eine Behauptung, die wir niemals aufgestellt haben, und genau ebenso steht es mit seiner Kritik der Silberoxydmethode zwecks Reinigung des Alkohols von Acetaldehyd. Wir haben dieses Verfahren niemals als quantitative Methode empfohlen, sondern es lediglich angewendet, um Hunderte von Grammen Äthylalkohol von den letzten Resten Aldehyd zu befreien[2]). Wir schreiben dabei ausdrücklich:

„Dabei wird auch etwas Alkohol zerstört, wir haben jedoch diesen Verlust in Kauf genommen, um zu einem einwandfreien Sprit zu gelangen."

Daraus erhellt zur Genüge, daß wir auch den Alkoholverlust keineswegs übersehen haben.

Zum Schluß wollen wir noch zur Vermeidung aller Mißverständnisse bemerken, daß wir nie die Rolle des Acetaldehyds beim Ablauf der alkoholischen Gärung bestritten haben, sondern

[1]) Chem. Centralblatt, 2, 362, 1906.

[2]) C. Neuberg und J. Kerb, Berichte 46, 2227, 1913.

im Gegenteil die ersten gewesen sind, die seine Bedeutung durch neuartige Versuche hervorgehoben haben. Allerdings ist dies nicht auf Grund der Isolierung mehr oder minder kleiner Mengen geschehen, sondern ausgehend von der massenhaften Produktion von Acetaldehyd bei der Brenztraubensäuregärung.

Gleichzeitig wollen wir die Gelegenheit benützen, darauf hinzuweisen, daß wir auch zuerst das Problem in Angriff genommen haben[1]), Acetaldehyd mittels Hefe in Äthylalkohol umzuwandeln. Ferner haben wir durch unsere Versuche[2]) gezeigt, daß dabei mehr Aldehyd verschwindet als dem Alkoholzuwachs entspricht. Dieselbe Tatsache konnten wir auch aus den Versuchen von Kostytschew, der s. Z. nichts darüber bemerkt hatte, ableiten, und hatten bereits der Vermutung Ausdruck verliehen, daß es sich hier um keinen einfachen Reduktionsprozeß, sondern um eine Umlagerung nach Cannizzaro handele. Diesen Gedanken hat dann auch Kostytschew, der bis dahin allein von einer Reduktion des Aldehyds zu Äthylalkohol gesprochen hatte, in seiner VI. Mitteilung experimentell weiter bearbeitet[3]). Übrigens hatte bereits Trillat[4]) eine Überführung des Acetaldehyds in Essigsäure durch Hefe beobachtet, die er allerdings als eine Oxydation aufgefaßt hat. Unsere Wünsche begegnen sich durchaus mit der Hoffnung Kostytschews, daß die Rolle des Acetaldehyds bei der Gärung bald geklärt werde.

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 114, 1912.
[2]) C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr **58**, 169, 1913.
[3]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 367, 1914.
[4]) A. Trillat, l. c.

Untersuchungen über die Wirkung von ultravioletten Strahlen auf die Lävulose.

Bildung von Formaldehyd und Kohlenoxyd.

Von

Albert Ranc.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Sorbonne, Paris.)

(Eingegangen am 18. April 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Diese Mitteilung berichtet über Untersuchungen, die wir, zum größten Teil in Gemeinschaft mit den Herren H. Bierry und Victor Henri, zur Erforschung der Wirkung von ultravioletten Strahlen des Quecksilberbogens auf die Lävulose angestellt haben. Außer der Beschreibung unserer Versuche geben wir eine Übersicht über die hauptsächlichsten Zerfallsreaktionen dieses Zuckermoleküls durch chemische Agenzien. Drittens erörtern wir im Anschluß an unsere Folgerungen noch ihre biologische Bedeutung[1]).

I. Formel und Konstitution der Lävulose.

Die Lävulose oder d-Fructose, ehemals Chylariose oder Fruchtzucker genannt, ist ein reduzierender Zucker aus der Klasse der Hexosen entsprechend dem natürlich vorkommenden Mannit oder Sorbit. Durch Reduktion liefert sie ein Gemisch von Mannit und Sorbit, und umgekehrt entsteht sie durch Oxydation des ersteren[2]). Sie gehört mithin zu der d-Reihe der Zucker trotz ihrer Linksdrehung. Sie ist eine Ketose; sie bringt keine Färbung der fuchsinschwefligen Säure[3]) zustande und bildet durch Oxydation keine Isomeren der Gluconsäure oder Zuckersäure[4]).

---

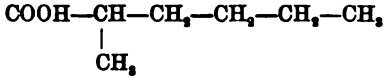
[1]) Beitrag zum Studium der physiologischen Lichtwirkungen. Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die Kohlenhydrate. (Albert Ranc, Dissertation, Paris 1914.)

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **17**, 573; **23**, 3684.

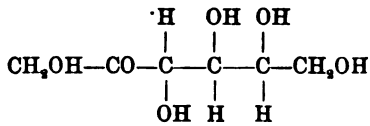
[3]) Villiers und Fayolle, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **119**, 1834.

[4]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **24**, 2683. — Hönig, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 171. — Herzfeld, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**, 3353; **19**, 390.

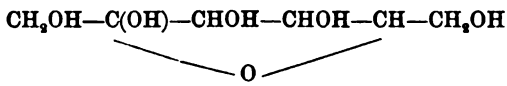
Die Stellung ihres Carbonyls wird durch die Untersuchung des Nitrils bewiesen. Das Lävulosecarbonsäure-Lacton, das durch Verseifung von ihr abgeleitet wird, liefert bei der Reduktion die Methyl-2-Hexanonsäure[1]):



Es ist also das Hexan—pentol $1\cdot\frac{4\cdot5}{3}\cdot6$—on 2 von der Formel:



Tollens[2]) faßt den inneren Ester folgenderweise auf:



Diese beiden Formeln sind gleichwertig; beide Formen können je nach den Umständen sehr leicht ineinander übergehen[3])

II. Zerfallsreaktionen.

Die Lävulose verändert sich durch Hitze. Nach Jungfleisch tritt bei 50° Gelbfärbung und ständige Abnahme der Drehung ein. Bei 120° ist die Zerstörung eine rapide[4]). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Jungfleisch und Grimbert behauptet Ost[5]), daß man Lävulose-lösungen im Wasserbade bis zur Sirupdicke einengen kann, ohne daß Zersetzung eintritt. Jedoch übertreffen die von diesem Verfasser angegebenen Drehungszahlen diejenigen in der Formel von Jungfleisch und Grimbert um ungefähr 3°. Die Oxydationsmittel bauen das d-Fructosemolekül glatt bis zu den Endstufen: Wasser und Kohlensäure, ab. Die dabei entstehenden Zwischenprodukte sind je nach der Natur der benutzten chemischen Agenzien und Anwendungsmethoden verschieden, doch wird immer das an die Ketongruppe angelagerte Molekül gespalten. Unter der vereinten Einwirkung von Chlor und Brom zerfällt die d-Fructose unter Bildung eines Gemisches von Glykolsäure und Trioxybuttersäure[6]). Mit Brom allein geht die Oxydation langsamer

[1]) Kiliani, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 221.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **16**, 921.

[3]) Maquenne, l. c.

[4]) Raymann und Sulc, Centralbl. **1** u. **2**, 1897.

[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **24**, 1636.

[6]) Hlasswetz und Habermann, Liebigs Annal. **155**; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **3**, 486. — Kiliani, Liebigs Annal. **205**. — Herzfeld, Liebigs Annal. **244**.

vor sich, als Endprodukte werden[1]) Oxalsäure und die rechtsdrehende Trioxybuttersäure beobachtet.

Salpetersäure bewirkt unmittelbare Zersetzung[2]) unter Abscheidung von Oxal-, Ameisen-, Glykol- und Mesoweinsäure, doch bildet sich weder rechtsdrehende Weinsäure noch Racemsäure, wie Hornemann[3]) glaubte, auch nicht Zuckersäure und Schleimsäure[4]).

Perdrix[5]) hat bei Oxydation der Lävulose durch Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung und unter starkem Erhitzen Kohlensäure und Ameisensäure nach der Formel:

$$C_6H_{12}O_6 + 8O = 2CO_2 + 4CH_2O_2 + 2H_2O$$

erhalten. J. Nef[6]), der die Oxydation der Lävulose durch Kupferhydroxyd und Natronlauge untersucht hat, fand, daß, wenn man einer mit Kupfersulfat versetzten Natronlösung eine zur Reduktion des gebildeten Kupferhydroxyds genügende Menge hinzufügt, die Oxydation bei 40° beginnt. Es entstehen die folgenden Säuren: Kohlen-, Ameisen-, Glykol-, Oxal-, Glycerin-, d, l-Erythron-, d-Glucon-, d-Mannonsäure. Derselbe Verfasser[7]) gewann Kohlendioxyd, Oxalsäure und Ameisensäure, indem er die d-Fructose mittels überschüssigen Silberoxyds in Gegenwart verdünnter Alkalien oxydierte. Rotes Quecksilberoxyd und Barytwasser geben unter Erhitzen Ameisensäure, Glykolsäure und Trioxybuttersäure[8]).

III. Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd.

Die Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Lävulose und im allgemeinen auf alle Zuckerstoffe ist nicht nur wegen der Oxydation mit darauffolgendem Zerfall dieser Stoffe interessant, sondern auch deshalb, weil auf Grund dieser Erscheinung eine allgemeine Methode der Kohlenhydratsynthese aufgebaut worden ist[9]). In der vorliegenden Abhandlung über die Spaltungen des Lävulosemoleküls gehen wir aber nur auf diejenigen Arbeiten näher ein, die sich direkt auf unsere Untersuchungen beziehen. Cross, Bevan und Smith[10]) einerseits, Morrell

[1]) Hönig, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 179. — Herzfeld und Winter, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 390.

[2]) Kiliani, Liebigs Annal. **205**, 145; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **14**, 2529. — R. H. Smith und B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **33**, 1277.

[3]) Journ. f. prakt. Chem. **89**, 283.

[4]) Neubauer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **10**, 827.

[5]) Bull. Soc. Chim. **23**, 645, 1900.

[6]) Annal. d. Chem. u. Pharm. **357**, 294, 1907.

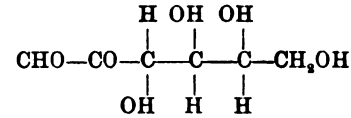
[7]) J. Nef, l. c.

[8]) Journ. f. prakt. Chem. **83**, 285.

[9]) Wenn man das Kalksalz einer den Aldehyzuckern entsprechende einbasische Säure mit so viel Wasserstoffsuperoxyd behandelt, daß 1 Mol. aktiver O_2 $^1/_2$ Mol. Säure trifft, so erhält man bei Gegenwart von Spuren Eisensalz den nächst niederen Zucker unter Entwicklung von 1 Mol. CO_2. Diese von Fenton entdeckte synthetische Methode ist von Ruff verallgemeinert worden. (E. Roux, Die neueren Arbeiten der Zuckerchemie. Rev. gén. d. S. **532**, 1904.)

[10]) Journ. Chem. Soc. **73**, 1898.

und Crofts[1]) andererseits haben durch Einwirkung von kleinen Mengen Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Eisensalzen auf Lävulose die Bildung des Osons beobachtet:



Morrell und Crofts[2]), die dasselbe Verfahren zur Darstellung des Glucosons aus Lävulose oder Glucose verwendeten, erhielten einen festen, weißen, amorphen Körper, der prompt bei gewöhnlicher Temperatur auf Phenylhydrazin einwirkt und dabei eine gute Ausbeute an Phenylglucosazon liefert. Außerdem studierten sie die Einwirkung großer Mengen Wasserstoffsuperoxyd auf Lävulose, welche Bildung von Glyoxylsäure, Glykolsäure, Trioxybuttersäure zur Folge hatte[3]). Morrell und Bellans[4]) fanden bei weiterer Untersuchung dieses Prozesses, daß während der allmählichen Zugaben von Wasserstoffsuperoxyd in der Menge von 1 g Mol. auf dasselbe Gewicht Kohlenhydrat das Drehungsvermögen sich proportional zur hinzugefügten Menge des Oxydans vermindert.

E. Buchner, J. Meisenheimer und H. Schade[5]) haben gezeigt, daß bei Zersetzung von Lävulose in alkalischer Lösung durch Luft oder Wasserstoffsuperoxyd Ameisensäure, Glykolsäure, r-Trioxybuttersäure und ein Rückstand entstehen, der verschiedene Hexonsäuren enthält. Essigsäure, Milchsäure und Oxalsäure haben sie nicht nachweisen können. Diese Forscher erklären diese Reaktion durch eine primäre Bildung von Glycerinaldehyd, der dann in drei Moleküle Formaldehyd zerfällt und durch endgültige Oxydation nach folgenden Gleichungen in Ameisensäure übergeht:

$$2CH_2O + H_2O_2 = 2H - COOH + H_2$$
$$CH_2O + H_2O_2 = H - COOH + H_2O.$$

Man findet in der Tat Spuren von Wasserstoff in den entweichenden Gasen. H. A. Spoehr[6]), der unter gleichen Versuchsbedingungen arbeitete, beobachtete Freiwerden von Kohlensäure und Ameisensäurebildung zu 48 bis 65% der theoretischen Menge.

IV. Einwirkung von Mineral- und organischen Säuren.

M. Berthelot und André[7]) stellten mehrere Versuche über den Einfluß von Säuren auf Lävulose an, deren Ergebnisse kurz zusammengefaßt werden können:

1 g, 24 Stunden lang im zugeschmolzenen Gefäß mit 5 ccm konzentrierter, reiner Salzsäure auf 100° erhitzte Lävulose liefert folgende Verbindungen:

[1]) Journ. Chem. Soc. **75**, 1899.
[2]) Journ. Chem. Soc. **81**, 1902.
[3]) Journ. Chem. Soc. **83**, 1903.
[4]) Journ. Chem. Soc. **87**, 1905.
[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **89**, 4217.
[6]) Amer. chem. Journ. **43**, 1910.
[7]) Annal. de Chim. et Phys. [7], **11**, 171.

Kohlensäureanhydrid	1,53%
Kohlenoxyd	3,10%
Ameisensäure	0,00%
Huminsäure	50,4%

1 g Lävulose, das unter den gleichen Bedingungen mit 25 ccm 12,5%iger Salzsäure erhitzt wird, liefert dieselben Körper, jedoch jetzt in abweichenden Mengen:

Kohlensäureanhydrid	0,29%
Kohlenoxyd	0,10%
Ameisensäure	8,10%
Huminsäure	14,60%

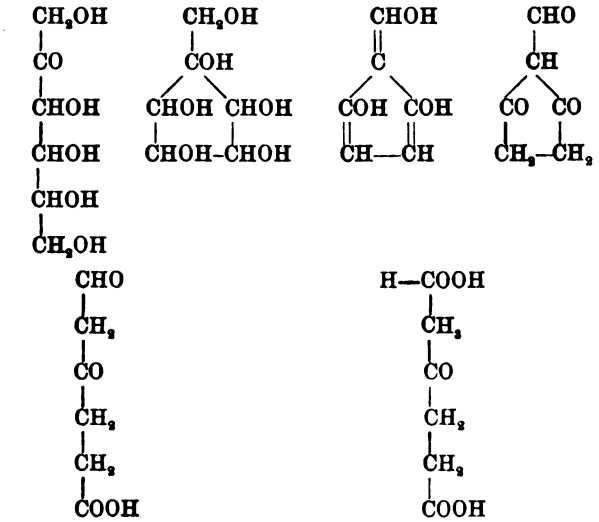
Dagegen haben die Autoren bei Erhitzen von 5 g Lävulose mit 55,88 g Orthophosphorsäure und 200 ccm Wasser, 479 Stunden lang im Luft- oder Wasserstoffstrom bei 120° erhalten:

Kohlensäureanhydrid	7,30%
Huminsäure	14,70%
Furfurol	0,46%

Diese Versuche zeigen ganz eklatant den Einfluß des Milieus und der Einwirkungsbedingungen der angewandten Reagenzien auf den Zerfall des Lävulosemoleküls.

Mit 9%iger Salzsäure konnten Conrad und Guthzeit[1]) Lävulinsäure zu 37% aus der so behandelten d-Fructose gewinnen.

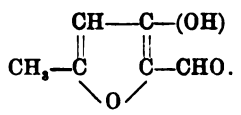
E. Erlenmeyer jun.[2]) hält die folgende Reaktion als durch Salzsäure bedingt für wahrscheinlich, die in der Bildung von Lävulinsäure und Ameisensäure ihren Abschluß finden:



[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 19, 2569.

[2]) Journ. f. prakt. Chem. 71, 1905.

Nach Düll[1]) soll sich eine Furfurolverbindung bilden, die ihrerseits durch Einwirkung von Oxalsäure auf Lävulose in Lävulinsäure übergeht. Auf 3 Atmosphären Druck 3 Stunden lang erhitzt, entsteht aus d-Fructose mit $^{3}/_{1000}$-Oxalsäure eine flüchtige, nicht destillierbare Flüssigkeit, die das Oxymethylfurfurol zu sein scheint



Überschuß von Oxalsäure führt dieses fast vollkommen in Lävulinsäure über.

Zusammenfassung: Die eben von uns aufgeführten verschiedenen Reaktionen tun alle dar, daß die d-Fructose sehr leicht durch Oxydantien angegriffen wird. Unter ihrer Einwirkung wird das Molekül dieses Zuckers stufenweise zerlegt und oft in die Endprodukte Kohlensäure und Wasser übergeführt. Bei einer solchen Zertrümmerung übt die Natur der oxydierenden Körper und die Versuchsmethode einen starken Einfluß nicht nur auf die zerstörte Lävulosemenge, sondern auch auf die Bildung der Zwischenprodukte aus. Wir haben außerdem gesehen, wie kompliziert die Säurenwirkung ist, die sich bei den Ketosen immer tiefgreifender als bei den Aldosen gestaltet. Aus der Gesamtheit all dieser Tatsachen geht mit großer Klarheit hervor, wie wenig Widerstandskraft dem Lävulosemolekül innewohnt. Auch den biochemischen Agenzien gegenüber kann man dieselbe Beobachtung machen. Bei seiner Besprechung der Thierfelderschen und Fischerschen[2]) Arbeit behauptet Duclaux[3]), daß die Gärfähigkeit der verschiedenen Zuckerarten je nach der Heferasse nicht dieselbe ist, daß aber die d-Fructose im ganzen am leichtesten vergärt.

Es sind viele Beispiele der Einwirkung von Mikroorganismen auf die d-Fructose bekannt, wo diese weniger schnell als die Glucose oder ein anderer Zucker verschwindet. Nach genauer Prüfung scheint aber doch die Lävulose eine leicht angreifbare Kohlenstoffkette zu besitzen.

Für das Mannitferment z. B., das von Gayon und Dubourg[4]) untersucht worden ist, ist nach Duclaux die Lävulose das Vorzugssubstrat. Es erzeugt aus ihr Mannit, Glycerin, Milchsäure, Essigsäure und Kohlensäure. Gibt man diesem Mikroorganismus einen Nährboden, der zu gleichen Teilen aus Glucose und Lävulose besteht, so wird letztere zuerst angegriffen.

---

[1]) Chem.-Zeitg. 216, 1895.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1894, 2031.

[3]) Traité de microbiol. 1901, 705.

[4]) Ann. de l'Inst. Pasteur 1894 und 1901.

Das Sorbosebakterium von Gabriel Bertrand[1]), das die Aldosen quantitativ in entsprechende einbasische Säuren umwandelt, zerstört die Ketosen langsam, ohne charakteristische Produkte zu liefern.

In Anbetracht all dieser, relativ einfachen und komplizierten Erscheinungen des chemischen wie biochemischen Zerfalls haben wir es uns zur Aufgabe gemacht, die Einwirkung ultravioletter Strahlen auf wässerige Lävuloselösungen zu studieren.

V. Spaltung der Lävulose durch ultraviolette Strahlen. Bildung von Formaldehyd.

Das Präparat, das wir für alle unsere Versuche benutzten, war durch Krystallisation in absolutem Alkohol gereinigte Lävulose. Zu diesem Behufe löst man in abs. Alkohol, der in einem Kolben mit Rückflußkühler auf dem Wasserbade erhitzt wird, fein gepulverte Lävulose auf. Ist die alkoholische Lävuloselösung bei Hitze gesättigt, so wird sie bei ungefähr 50° filtriert, das Filtrat in einer fest verschließbaren Flasche gesammelt und dann die Lösung in Gegenwart von Spuren Wasser abgekühlt. Nach 24 Stunden erhält man sehr schöne Lävulosekrystalle, die man sorgfältig[2]) im Schwefelsäurevakuum trocknet, nachdem man sie an der Luft getrocknet und mit kaltem absolutem Alkohol schnell gewaschen hat. Die auf solche Weise im absoluten Alkohol zwei- oder dreimal umkrystallisierte Lävulose ist ein durchaus reines Präparat, deren physikalische Eigenschaften den in der Literatur angegebenen entsprechen.

In den ersten Versuchen, die wir mit Lävulose in wässeriger Lösung angestellt haben, konnten wir feststellen, daß in allen Versuchsanordnungen die den ultravioletten Strahlen ausgesetzten Lösungen einen starken Formaldehydgeruch verbreiteten. Dieser Umstand bewog uns, das Methanal einer genaueren Untersuchung und Charakterisierung zu unterziehen.

Methode der Formaldehydbestimmung. Es gibt zahlreiche Methoden, die zum Nachweis von Formaldehyd ausgearbeitet worden sind. Das kommt daher, weil dieser

---

[1]) Dissertation, Paris 1904.

[2]) Die aus absolutem Alkohol auskrystallisierte Lävulose absorbiert leicht Luftfeuchtigkeit und zerfällt, wenn sie nicht vollständig wieder von Alkohol befreit ist, den sie von der Krystallisation her zurückhält.

Körper bei seiner Einwirkung auf eine große Zahl von Verbindungen leicht Reduktions- oder Kondensationsprodukte liefert, die wegen ihrer leichten Bestimmbarkeit von vielen Autoren für den analytischen Nachweis benutzt worden sind. Andererseits hat das praktische Interesse das die Folge der industriellen Bedeutung dieses Stoffes als Antisepticum ist, den Ansporn zu Spezialarbeiten auf diesem Gebiete gegeben. Aus der Fülle der vorhandenen Methoden muß man nun die jeweilig geeignete wählen. Einige sind nicht brauchbar, weil sie es an der genügenden Genauigkeit fehlen lassen, andere wiederum sind nicht spezifisch genug auf Formaldehyd eingestellt. So wird das Tollenssche Reagens, ammoniakalisches Silbernitrat, durch Formaldehyd in der Hitze schnell reduziert und ebenso durch alle Körper mit Aldehydreaktion. Das gleiche gilt für Kaliumquecksilberjodid in alkalischer Lösung, das in der Kälte durch Formaldehyd und die anderen Aldehyde energisch reduziert wird.

Lange glaubte man, daß das durch schweflige Säure entfärbte Fuchsin, das seit 40 Jahren von Schiff[1]) und Caro[2]) zur Bestimmung der Aldehyde benutzt worden ist, für den Nachweis der einen oder anderen dieser Verbindungen nicht in Betracht käme. Die Versuche von Rouillard und Goujon[3]) und von Denigès[4]) haben jedoch den Beweis erbracht, daß man durch eine Modifikation in der Anwendungstechnik der fuchsinschwefligen Säure Formaldehyd neben anderen Aldehyden, besonders neben seinem nächst höheren Homologen, dem Acetaldehyd, bestimmen kann. Formaldehyd gibt mit dem durch schweflige Säure entfärbten Fuchsin (gleiche Volumina des Reagens und der verdünnten Formollösung) eine violette Färbung wie alle Körper, welche die Aldehydgruppe enthalten. Beim Formaldehyd jedoch zeigt diese Farbe ganz ausgesprochene Intensität und Beständigkeit, während sie bei den anderen Aldehyden sehr schwach und vergänglich ist. In Gegenwart überschüssiger Säure verschärfen sich diese Unterschiede in solchem Grade, daß man die fuchsinschweflige Säure in schwefel-

[1]) Zeitschr. f. Chem. **1867**, 175.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**, 2342.
[3]) Ann. des falsifications **1910**, Nr. 15.
[4]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 28. Juni **1910**.

saurer Lösung als spezifisches Reagens für Formaldehyd ansehen kann.

Nach Bonis[1]) stellt sich bei einer mit $^1/_5$ ihres Volumens reiner Schwefelsäure versetzten Acetaldehydlösung mit Fuchsinbisulfit gar keine Färbung ein. Enthält die Lösung 5 g pro Liter, so erhält man eine kaum sichtbare, zartblaue Tönung, die nach 2 Stunden verschwindet. Mit Formaldehyd hingegen, 0,010 g pro Liter, erhält man eine kräftige violette Farbe, die andauernd dunkler wird und länger als 8 Tage anhält. In allen unseren Versuchen haben wir diese Reaktion benutzt, nachdem wir die Spezifität nach den Angaben von Denigès kontrolliert hatten.

Die Darstellung der fuchsinschwefligen Säure gestaltete sich folgendermaßen:

In einen geeichten, 250 ccm fassenden Glaskolben gießt man
30 ccm mit 35%igem Alkohol (1 : 1000) verdünnte Fuchsinlösung,
15 „ Natriumbisulfitlösung von 36° B,
30 „ destilliertes Wasser.

Der Glaskolben wird zugepfropft, geschüttelt und 1 Stunde sich selber überlassen. Jetzt fügt man 15 ccm aufs 3fache verdünnte Schwefelsäure hinzu und füllt auf 250 ccm mit reinem 50grädigen Alkohol[2]) auf. Man erhält auf diese Weise eine leicht getönte Lösung, die sich sehr schnell wieder entfärbt.

Zur Ermittlung des Formaldehyds mit Hilfe dieses so bereiteten Reagens sind wir nun wie folgt verfahren:

Zu 5 ccm der zu analysierenden Lösung fügt man 1 ccm schweflige Säure (D = 1,66) hinzu, außerdem 5 ccm der fuchsinschwefligen Säure. Die Gegenwart von Formaldehyd gibt sich durch das Erscheinen einer violetten Färbung kund, die ein Maximum erreicht, das mehrere Tage konstant bleibt.

Die mit dieser analytischen Methode gewonnenen Resultate wurden stets an der Hand der Trillatschen[3]) Reaktion kontrolliert, die auf folgendem Prinzip beruht: Bekanntlich kondensiert sich leicht 1 Molekül Methanal mit 2 Molekülen Dimethylanilin unter Abspaltung eines Wassermoleküls zu Tetramethyldiaminodiphenylmethan. Diese farblose Verbindung wird durch Oxydation mit Bleisuperoxyd in essigsaurer Lösung

---

[1]) Ann. des falsifications 15. März 1910.

[2]) Das Rosanilinbisulfit hält sich besser in alkoholischer als in wässeriger Lösung.

[3]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 116, 891, 1893.

in ihr entsprechendes Hydrol, das blau[1]) ist, übergeführt. Die Entwicklung dieses blauen Farbtones deutet auf die Gegenwart von Formaldehyd in den Lösungen, die der Dimethylanilinprobe unterworfen werden, hin. Zu diesem Zwecke erhitzt man $^1/_2$ Stunde lang $^1/_2$ ccm reines Dimethylanilin mit der zu prüfenden Lösung, die durch Schwefelsäure leicht angesäuert ist. Nach Alkalinisierung mittels Natronlauge läßt man die Mischung kochen, bis aller Überschuß an Dimethylanilin verschwunden ist, wovon man sich durch Ausbleiben des charakteristischen Geruchs vergewissern kann. Nach Abkühlen filtriert und wäscht man wiederholt mit destilliertem Wasser. Das auf einer kleinen Porzellanschale ausgebreitete Filter befeuchtet man mit Eisessig und wirft auf seine Oberfläche einige Körnchen fein gepulvertes Bleisuperoxyd. Das Vorhandensein von Spuren Tetramethyldiamidodiphenylmethan, was für die Gegenwart von Spuren Formaldehyd in der zu analysierenden Lösung zeugt, gibt sich durch das Auftreten einer ganz deutlichen Blaufärbung kund.

Versuch 1.

Eine reine 1%ige Lävuloselösung in destilliertem Wasser wird in einem kleinen Krystallisiergefäß aus böhmischem Glas den von einer Quarzquecksilberlampe herrührenden ultravioletten Strahlen ausgesetzt, die bei 60 Volt und 3 Amp. die Luft durchdringen. Nach 2 Stunden hat die Flüssigkeit 52° erreicht und verbreitet den charakteristischen stechenden Formaldehydgeruch. Dieses kann man außerdem direkt durch die Trillatsche Reaktion und durch rosanilinschweflige Säure in schwefelsaurer Lösung nachweisen. Eine gleiche, in gleichem Gefäß bei 50° im Brutschrank belassene Lösung zeigt gar keine Veränderung.

Versuch 2.

Unter das 60 mm lange Quarzrohr der Lampe setzt man nebeneinander zwei kleine, 1%ige Lävuloselösung enthaltende Gefäße. Eines ist mit einer Glasplatte von 2 mm Dicke bedeckt, das andere mit einer Quarzplatte von denselben Dimensionen. Nach Ablauf von 2 Stunden nimmt man die Bestimmungen der Lösungen mittels der üblichen Rea-

[1]) Die Trillatsche Reaktion kann durch folgende Gleichungen dargestellt werden:

$$CH_2O + 2\,[C_6H_4N(CH_3)_2] = CH_2\begin{matrix}C_6H_4N(CH_3)_2\\C_6H_4N(CH_3)_2\end{matrix} + H_2O$$

$$CH_2\begin{matrix}C_6H_4N(CH_3)_2\\C_6H_4N(CH_3)_2\end{matrix} + O = CHOH\begin{matrix}C_6H_4-N(CH_3)_2\\C_6H_4-N(CH_3)_2\end{matrix}$$

Hydrol des Tetramethyldiaminodiphenylmethans.

genzien vor und konstatiert, daß von den beiden Proben, die eine eine Temperatur von unter 50° aufweist, nur die eine, und zwar die mit dem Quarzplättchen bedeckte, Formaldehyd enthält.

Versuch 3.

In einen kleinen Quarzkolben von 50 ccm Inhalt gießt man 30 ccm reine, in destilliertem Wasser zu 1% gelöste Lävulose. Man verschließt den Kolben mit einem Korkpfropfen und bringt ihn unter die Quecksilberlampe in eine solche Entfernung, daß die Temperatur der Flüssigkeit nicht 50° überschreitet.

Die polarimetrische Untersuchung ergibt eine Ablenkung von $\alpha_{20}^{d} = -2°$. Nach weiterer 23stündiger Einwirkung zeigt die Ablesung $\alpha_{20}^{d} = -1° 30'$ und nach 47 Stunden fällt der Wert der Ablenkung auf $\alpha_{20}^{d} = -1° 22'$. Der Versuch wird dann unterbrochen, die Gegenwart von Formaldehyd in dieser Lösung, die mit Lackmus stark sauer reagiert, deutlich nachgewiesen.

Versuch 4.

6 ccm reine, in 250 ccm dest. Wasser gelöste Lävulose werden in einem Quarzkolben der Einwirkung von ultravioletten Licht bei einer Temperatur unterhalb 50° ausgesetzt. Die Anfangsdrehung dieser Lösung beträgt $-4°36'$, nach 24 Stunden $-4°$ und steigt auf $-3°30°$ in der 68. Versuchsstunde, um nach 116 Stunden den Wert von $-3°10'$ zu erreichen. Diese Lösung weist Formaldehyd auf und gibt mit Lackmus saure Reaktion. Nach kurzem Aufkochen färbt sie sich gelb unter Abgabe von Dämpfen, die Lackmuspapier röten. Ein Teil wird in einem Wasserdampfdestillationsapparat destilliert. Das Produkt ist eine leicht saure Flüssigkeit mit den charakteristischen Reaktionen des Formaldehyds. Eine ebenso behandelte Kontrollprobe zeigt keine Veränderung.

Versuch 5.

Eine 15%ige Lävuloselösung wird bei 70 bis 80° von ultravioletten Strahlen im Quarzkolben bestrahlt. Nach 3 Stunden wird die Lösung schwach gelb, und es entwickeln sich Gasbläschen innerhalb dieser so behandelten Flüssigkeit. Unterbricht man den Versuch in diesem Stadium, so bemerkt man, daß Formaldehyd und saure Verbindungen sowohl in der Lösung selber als auch in dem Destillationsprodukt anwesend sind.

Versuch 6.

3 g reine, in 30 ccm destilliertem Wasser gelöste Lävulose werden den ultravioletten Strahlen einer Quecksilberlampe von 3 Amp. und 60 Volt ausgesetzt. Diese Lösung wird in einem Quarzkolben ziemlich nahe von dem leuchtenden Rohr der Lampe aufgestellt, so daß die Versuchslösung ungefähr eine Temperatur von 80° hat. Der Quazrkolben wird mit einem Korken zugepfropft, der mit einem gebogenen Rohr versehen ist, das in eine trichterförmige, 20 ccm dest. Wasser fassende

Flasche taucht. Nach mehrstündiger Einwirkung beginnt eine Gasentwicklung.

Bricht man den Versuch nach 48 Stunden ab, so beobachtet man die Gegenwart von Methanal in der angesetzten Probe und in dem Wasser, wo während der Einwirkung der ultravioletten Strahlen die Gasbläschen aufgestiegen sind.

Versuch 7.

Etwa 30 cm vom Quarzrohr einer 500-Volt-Quecksilberlampe, die in freier Luft bei 394 Volt und 4 Amp. brennt, wird ein Quarzkolben mit 50 ccm einer reinen 10%igen Lävuloselösung aufgestellt. Man hält die Temperatur der unteren Lösung auf 20°, indem man um den Kolben kaltes Wasser strömen läßt. Unter diesen Versuchsbedingungen kann man nach einer halben Stunde Formaldehyd in der sich zersetzenden Lävuloselösung nachweisen, in der eine Gasbildung vor sich geht.

Folgerungen: Unsere Versuche haben ergeben, daß wässerige, mit ultravioletten Strahlen bestrahlte Lävuloselösungen bei Temperaturen zwischen 20 und 70° sich unter Formaldehydentwicklung[1]) zerlegen. Nach uns haben Berthelot und Gaudechon[2]) die Bildung dieses Körpers beobachtet, als sie 10%ige Lävuloselösungen denselben Einwirkungen bei 80 bis 90° aussetzten. Diesen Ergebnissen gebührt ein gewisses biologisches Interesse. Zur Erklärung der Kohlenhydratbildung in der grünen Pflanze aus Kohlensäure und Wasser stellte Baeyer[3]) die Hypothese auf, daß Formaldehyd die erste Stufe in der Reihe der Reaktionen sei, die in dieser Synthese ihren Abschluß finden.

Seine Theorie wurde zum Teil bestätigt, als es Fischer[4]), nach den vorangegangenen Versuchen von Butlerow[5]), Tollens[6]) uud Loew[7]) in genialer Weise gelang, einen Zucker mit sechs Kohlenstoffatomen unter den Kondensationsprodukten des Formaldehyds in alkalischer Lösung nachzuweisen. Die Möglichkeit des chemischen Prozesses bei der Kohlenhydratbildung, so wie sie Baeyer postuliert hatte, wurde endlich glänzend gerechtfertigt, als

---

[1]) Bierry, V. Henri u. A. Ranc, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 25. Juli 1910.

[2]) Berthelot u. Gaudechon, ibid. 1. August 1910.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 3, 67.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 988.

[5]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 53, 145; Liebigs Annalen 120, 295.

[6]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 15, 1629; 16, 917.

[7]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 20, 141 u. 3029.

Fenton durch Mischung von Kohlensäure mit Wasser in Gegenwart von Magnesium Methanal erhielt. Die lückenlose Aufeinanderfolge der bei der Zuckersynthese stattfindenden Reaktionen, erst die Formaldehydbildung, dann seine endgültige Kondensation bis zur fertigen Hexose konnte also vollständig auf chemischen Wege verwirklicht werden.

Bach versuchte im Jahre 1893 Formaldehyd auf photochemischem Wege synthetisch darzustellen. In einer ersten Versuchsreihe[1]) ließ der Verfasser einen Strom absolut reiner Kohlensäure Wasser passieren, das einen Katalysator in Lösung enthielt (Uranacetat zu 1,5 %) und sich in einer den Sonnenstrahlen ausgesetzten Glasflasche befand. Schon nach relativ kurzer Zeit, nach 20 bis 30 Minuten, beobachtete er die Bildung eines Niederschlags, das er als ein Gemisch von Urano- und Uranihydroxyd erkannte. Außerdem konnte er durch Kontrollversuche feststellen, daß diese Körper nur durch die gemeinsame Einwirkung der Kohlensäure, des Wassers und der Sonnenstrahlen zustande kamen. Bach deutete diesen chemischen Vorgang durch die Annahme, daß bei dieser Versuchsanordnung die Kohlensäure sich in Formaldehyd und Überkohlensäure spaltete. Dieser letztere Körper gäbe dann mit Uranacetat Uranpercarbonat, dann durch weitere Zerlegung Uranperoxyd, das durch Formaldehyd reduziert würde und Urano- und Uranihydroxyd lieferte.

Die Hypothese von Bach wurde in bezug auf die Formaldehydbildung auf Kosten von Kohlensäure nnd Wasser in Gegenwart von Sonnenlicht in einer zweiten Versuchsreihe bestätigt[2]). Durch Leiten eines Kohlensäurestroms durch eine wässerige Lösung, die etwas Dimethylanilin enthielt, wies dieser Forscher in den dem Sonnenlicht voll ausgesetzten Flaschen Tetramethyldiamidodiphenylmethan nach, das ein Kondensationsprodukt des während des Prozesses gebildeten Formaldehyds mit Dimethylanilin ist. Das Vorhandensein dieser Verbindung, die leicht, wie schon oben ausgeführt, durch die Trillatsche Reaktion, nachzuweisen ist, faßte Bach als Beweis der Methanalsynthese auf, für die er schon in seinen früheren Untersuchungen Anhaltspunkte gefunden hatte.

[1]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **116**, 1145, 1893.
[2]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **116**, 1389, 1893.

Die Gültigkeit dieser Befunde wurde später von Euler[1]) in Zweifel gezogen. Endgültige Bestätigung fanden sie jedoch durch Usher und Priestley[2]), so daß Bach als der wirklich erste angesehen werden darf, der die photochemische Synthese des Formaldehyds bei fehlendem Chlorophyll durch die direkte Verbindung von Kohlendioxyd mit Wasser in Gegenwart von Photokatalysatoren durchgeführt hat.

In einer ganzen Reihe von Untersuchungen bewies Neuberg[3]), daß allgemein chemische Reaktionen, die durch das Sonnenlicht mittels Katalysatoren, wie z. B. Uran- und Eisensalze, sich vollziehen, durch ultraviolette Strahlen entstehen können. Für den speziellen Fall der künstlichen photochemischen Synthese des Formaldehyds gewannen Daniel Berthelot und Gaudechon[4]) experimentelle Resultate, die mit den Anschauungen und Beobachtungen der vorangehenden Verfasser in vollem Einklang stehen.

Diesen beiden gelang die Vereinigung von Kohlensäure und Wasserstoff durch die Einwirkung von ultravioletten Strahlen unter Formaldehydentwicklung unter folgenden Bedingungen:

Ein Gemisch von 2,02 ccm Kohlenoxyd mit 1,78 ccm Wasserstoff wird $13^1/_2$ Stunden 1 cm von einer Quecksilberlampe entfernt ihren Strahlen ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit findet man das Volumen dieser beiden Gase auf 1,65 ccm gesunken und bemerkt fest gewordene, polymerisierte Formaldehydtröpfchen, die durch ammoniakalische Silbernitratlösung gefällt werden.

Ein Gemisch von 1,70 ccm CO_2 und 1,29 ccm H_2 liefert in derselben Zeit Formaldehyd, der das Tollenssche Reagens in großen Mengen niederschlägt. Aus der Beschreibung der Versuche, die bei sehr hohen Temperaturen ausgeführt wurden (da die zu bestrahlende Lösung nur 1 cm von dem leuchtenden Rohr der Quarzbrenner entfernt war) geht hervor, daß die Synthese dieser Autoren weit davon entfernt ist, sich unter Bedingungen, die den natürlichen gleichkommen, zu vollziehen.

---

[1]) J. Duclaux, Chimie de la matière vivante. Paris, F. Alcan.

[2]) ibidem.

[3]) Diese Zeitschr. **13**, 305, 1908; **17**, 270, 1909; **27**, 271, 1910; **29**, 279, 1910.

[4]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 20. Juni 1910.

Immerhin zeugt die Formaldehydbildung durch Verbindung von Kohlenoxyd mit Wasserstoff, die aus dem photochemischen Abbau der Kohlensäure stammen kann, für die Wichtigkeit der Baeyerschen Gedanken, die auf photochemischem Gebiete durch die Untersuchungen von Bach und Neuberg experimentell gestützt sind. Moorres Versuche, in denen einerseits als Katalysatoren das kolloidale Uran und Eisen benutzt wurden, andererseits dieselben Resultate ohne Katalysatoren, aber mit ultravioletten Strahlen erzielt wurden, erhöhen noch die Bedeutung der Arbeiten, die wir hier nur in Kürze behandelt haben, und liefern an und für sich einen wichtigen Beitrag zur Lösung dieser großen biologischen Frage. Kurz, die Hypothese von Baeyer von der Kohlenhydratassimilation in der Pflanze scheint sich voll zu bewahrheiten. Die photochemische Synthese des Methanals aus Kohlensäure und Wasser steht endgültig fest, ebenso wie die Entwicklung von Zuckerverbindungen der Hexosenklasse durch Kondensation von Formaldehyd in Gegenwart von Alkalien[1]).

Wenn die photochemische Synthese eines Zuckers wie die der Lävulose oder Glucose ohne Zuhilfenahme von chemischen Agenzien noch nicht verwirklicht ist[2]), so ist sie doch nun als demnächst bevorstehendes Faktum wahrscheinlich. Auch die von einem anderen Gesichtspunkte aus unternommenen Untersuchungen sprechen sehr günstig für die Anschauung von Baeyer, nämlich diejenigen über die Anwesenheit von Methanal in den Pflanzen.

---

[1]) Stoklasa und Zdobnický haben festgestellt, daß unter der Einwirkung von ultravioletten Strahlen sich Aldosen oder Ketosen der Hexosenklasse bilden, wenn man in alkalischer Flüssigkeit Kohlensäure mit nascierendem Wasserstoff zusammenbringt. Diese Zeitschr. **30**, 433, 1911.

[2]) In der Mitteilung von D. Berthelot und Gaudechon: „Kohlenhydratsynthese auf Grund von Kohlensäure und Wasserdampf, bei fehlendem Chlorophyll; photochemische Synthese der quaternären Körper" (Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 20. Juni 1910) handelt es sich nur um die photochemische Synthese von Formaldehyd durch Verbindung von Kohlenoxyd mit Wasserstoff. Diese Arbeit bringt also gar keine Erweiterung unserer Kenntnis über die photochemische Synthese der Verbindungen wie Triosen, Tetrosen, Pentosen, Hexosen, Polyosen, Polysaccharide, für welche die Autoren die Bezeichnung „Kohlenhydrate" gewahrt wissen wollen.

Seit den ersten Forschungen von Reinke im Jahre 1881 haben sich Mori, Opitz, Pollaci, Bokorny, Planche und Ravenna, Kaimazu, Schryver, Grafe, Stoklasa und Zdobnický, Kimpflin, Gilson mit dieser Frage befaßt und die Gegenwart von Methanal in den Blättern zu konstatieren vermocht.

Curtius und Franzen[1]) haben diese Arbeiten 1910 wieder aufgenommen und dabei den Formaldehyd in dem Destillationsprodukt von mehreren Kilogrammen Blättern verarbeitet. Diese Methode basiert auf der Oxydation und Umwandlung des Methanals in Ameisensäure bzw. in ein leicht analysierbares Salz derselben.

Die sehr umfangreichen Untersuchungen dieser Autoren lieferten ein bemerkenswertes Resultat. Sie wiesen in der Tat in den Pflanzen α- und β-Hexylenaldehyd, Ameisen-, Essig- und Hexylensäure nach und fanden 0,000 861 3 g Methanal per Kilogramm Blätter neben Acetaldehyd, Butylaldehyd, Valeraldehyd und eine Anzahl Alkohole. Die Tatsache, daß man Methanal in grünen Pflanzen findet, kann als ein neues Argument zugunsten von Baeyers Assimilationstheorie angesehen werden.

Curtius und Franzen sind der Meinung, daß der Formaldehyd ein Zwischenprodukt ist, das zwar schwer zu fassen, aber doch immer bei den Stoffwechselprozessen der Pflanze beteiligt ist, vielleicht das Endprodukt der photochemischen Verbindungen von Kohlensäure und Wasser während der Chlorophyllassimilation. Auf Grund unserer Versuche wissen wir, daß er auch eine der möglichen Abbaustufen des Zuckermoleküls darstellt. Einerlei, ob das Methanal als intermediärer Körper in einem synthetischen Prozeß oder in einer Reihe von Spaltungsreaktionen eines komplexen Moleküls auftritt, seine bloße Gegenwart dokumentiert in jedem Falle die bedeutende Rolle, die er im Leben der Pflanze spielt. Die Aldehydgruppe gehört ja in der Tat zu den aktivsten und meist verbreitetsten in der organischen Chemie. Die Zahl der Verbindungen, der Kondensationen, die der organische Chemiker durch Einwirkung von Formaldehyd auf organische Gebilde

[1]) Ber. d. Heidelberger Akad. d. Wiss. 1910. (Vollständige Literaturübersicht über dieses Problem.)

erhalten kann, ist sehr groß. Liegt dann nicht die Vermutung nahe, daß inmitten der so zahlreichen, im pflanzlichen Organismus vorkommenden Körper das Methanal ein Faktor von ganz hervorragender Bedeutung bei der Produktion der Farb- und Riechstoffe ist, deren Ursprung noch der Aufklärung dringend bedarf? Bei dieser Betrachtungsweise wird jedoch nur ein spezieller Punkt ins Auge gefaßt. Setzt man aber unseren Befund mit der Gesamtheit der pflanzlichen Ernährungsvorgänge in Beziehung, so ergibt sich eine Parallele im entgegengesetzten Sinne zwischen den synthetischen Prozessen, dem Aufbau in die immer größeren Kohlenhydratmoleküle, vom Wasser und der Kohlensäure ausgehend, und den etappenförmigen Degradationen desselben Moleküls bis zu den Anfangsstufen der Chlorophyllsynthese, Wasser und Kohlensäure. In diesem Gedankengange könnten wir unser experimentell gewonnenes Ergebnis mit den Ansichten von Duclaux über die Ernährungsverhältnisse der Mikroorganismenzelle in Zusammenhang bringen. Dieser Forscher schreibt, daß die komplexen Zucker, die man Bakterien als Nahrung gibt, aufgespalten und, vielleicht im Augenblick der Aufnahme, „auf eine Stufe gebracht werden, die dem Ausgangspunkt der Chlorophyllzelle ganz ähnlich ist". Der Formaldehyd wäre demnach der einzige fundamentale Bestandteil der Synthese und zugleich der organischen Zerlegung des Zuckers.

VI. Untersuchung der während der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht auf Lävulose gebildeten Gase. Kohlenoxydentwicklung.

Bei der Beschreibung unserer Versuche, die ergeben haben, daß Formaldehyd ein Spaltungsprodukt der d-Fructose durch Einwirkung von ultravioletten Strahlen ist, haben wir schon eine Gasbildung während unserer Manipulationen erwähnt. Zur näheren Erforschung der so gebildeten Gase haben wir eine Zahl Versuche angestellt, deren Technik folgende war.

Versuchstechnik: Zum Aufsammeln der während der Zersetzung einer beliebigen Lösung durch ultraviolette Strahlen gebildeten Gase haben wir einen Apparat konstruiert, der aus folgenden Teilen besteht:

1. Aus einem Quarzkolben von 250 ccm Inhalt, der mit einem eingeriebenen Glasstöpsel verschlossen ist. Durch letzteren geht ein U-förmiges Capillarrohr, dessen oberes Ende mit einem Hahn versehen ist;

2. aus einem graduierten Rohr mit Hahn, das in einer Quecksilberwanne steht;

3. aus einem U-förmig gebogenen Ableitungsrohr, das den Tubulus des Quarzkolbens mit dem Innern des Rohres verbindet und so konstruiert ist, daß sein Ende in derselben Höhe wie der Hahn dieses Rohres sich befindet. Auf diese Weise gestattet der Apparat, die gebildeten Gase im Quarzkolben unter vermindertem Druck aufzufangen.

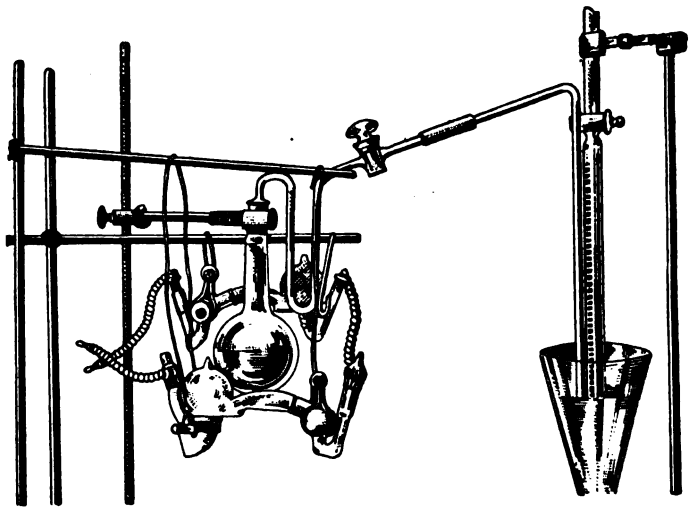


Fig. 1.

Ist die Versuchslösung im Kolben und die Gasbürette mit Quecksilber gefüllt, ebenso wie das Steigrohr bis zum Hahn der Kolbenöffnung, so kann die Bestrahlung beginnen, indem man zwei um das Quarzgefäß parallel aufgestellte Lampen anzündet.

Die Temperatur wird durch Veränderung des Abstandes der Lampen oder durch Berieseln der Kolbenwände mit kaltem Wasser geregelt. Die während der Irridiation entstehenden Gase sammeln sich in dem Rohr und können dann in die zur Gasanalyse üblichen Büretten übergeleitet werden.

Mit diesem Apparat haben wir unsere photochemischen Abbauversuche mit Lävulose ausgeführt.

Versuch 1.

Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Lävuloselösungen bei 70° und im Vakuum: 100 ccm reine, zu 8% in destilliertem vollständig ausgekochtem Wasser gelöste Lävulose werden in den Quarzkolben gebracht. Darin wird durch Saugen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, die an die U-förmige Öffnung des Apparates angepaßt ist, ein luftleerer Raum geschaffen. Nach festem Verschluß des Hahnes dieses Tubulus bringt man

das Ableitungsrohr mit dem Kolben und der Gasbürette in Verbindung, die mit Quecksilber gefüllt wird. Hierauf öffnet man recht vorsichtig den mittleren Hahn, damit eine ganz kleine Quecksilberkuppe sich an das untere Ende des U-Bogens der Öffnung am Quarzkolben absetzt.

Der Apparat ist so angeordnet, daß sich der Kolben zwischen den beiden Röhren der Quecksilberbrenner befindet, die bei einer Spannung von 60 Volt und mit einer Stromstärke von 3 Amp. arbeiten. Durch einen Schirm von schwarzer Pappe schützt man das Ableitungsrohr und die Röhre vor der Lampenbestrahlung.

Gleich zu Anfang der Belichtung dehnt sich durch die Hitze das Gasvolumen aus, was sich durch Aufwärtsbewegung des Quecksilbermeniscus in dem Tubusarm kundgibt. Nach $^1/_4$ Stunde beginnt die Gasentwicklung. Deutlich sieht man die Gasbläschen in der Flüssigkeit aufsteigen und an der Oberfläche zerplatzen. Da der Druck im Innern des Kolbens wächst, steigt der Quecksilberspiegel weiter, bis er sich gegen den Hahn drückt. In diesem Augenblick öffnet man den Hahn, und die schon gebildeten Gase entweichen dann in das graduierte Gassammelrohr, wo die Gasentwicklung ihren regelmäßigen Verlauf nimmt. Nach 24stündiger Bestrahlung entnimmt man bei 70° von dem Gesamtvolumen der entwickelten Gase (etwa 100 ccm) 37 ccm über Hg gemessen und leitet sie in eine Gassammelröhre bei 25° und 753 mm Druck über.

Gasanalyse. Durch Auswaschen mit destilliertem Wasser entfernt man 0,7 ccm Gas. Nach Einbringung einer Ätzkalipastille verschwinden 1,7 ccm in der alkalischen Lösung lösliches Gas. Auswaschen mit alkalischem Pyrogallol, das sich leicht dabei schwärzt, ergibt keine meßbare Absorption.

Von den für die Analyse entnommenen 37 ccm Gas bleiben also noch 34,6 ccm in Wasser unlösliches und durch basische Lösungen und alkalisches Pyrogallol unlösliches Gas. Diese unterwirft man dann der Wirkung einiger spezifischer Reagenzien.

7 ccm Gas werden in eine mit Hahn versehene Bürette übergeführt und mit einer salzsauren Kupferchlorürlösung[1]) gewaschen. Fast unmittelbar wird das Gas quantitativ absorbiert.

5 ccm Gas werden über Quecksilber mit gekochter Schwefelsäure geschüttelt, ohne daß Absorption zustande kommt.

---

[1]) Zur Darstellung einer salzsauren Kupferchlorürlösung erhitzt man gelinde in einem Kolben 65 g krystallisiertes Kupferchlorid mit 300 g reiner Salzsäure und fügt 40 g Kupferdrehspäne hinzu. Der Kolben wird mit einem durchbohrten Stöpsel mit Rohr versehen und erhitzt, bis die Lösung farblos wird. In diesem Augenblick gießt man die Lösung in 1 l kaltes Wasser. Das Kupferchlorid wird ausgefällt, abdekantiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Man löst nachher in konzentrierter Salzsäure auf und bewahrt die Lösung unter Abschluß von Luft und Licht in einem Kolben auf, der Kupferdrehspäne enthält. Dieses Metall führt das Salz, das sich inzwischen hätte verändern können, in den Zustand des Kupferchlorids zurück.

7 ccm Gas werden in einer Gasbürette mit Hahn mit 5 ccm defibriniertem, 1 : 1000 verdünntem Pferdeblut geschüttelt. Nach einigen Minuten der Berührung wird die Hämoglobinlösung, deren Farbe rotviolett geworden ist, aus dem Gasrohr genommen und mit einer Kontrollprobe von Oxyhämoglobin spektroskopisch verglichen. In der Versuchslösung beobachtet man zwei reine Oxyhämoglobinstreifen, doch in dem einen rechts vom Spektrum gelegenen Streifen ist die D-Linie mit größerer Deutlichkeit als bei der Testlösung zu sehen. Wenn man andererseits der zu untersuchenden Probe 2 Tropfen frisch hergestelltes Natriumhydrosulfit hinzufügt, so tritt der einzige Streifen des reduzierten Hämoglobins nicht auf.

Die Gesamtheit dieser Reaktionen läßt darauf schließen, daß die aus dem Versuch hervorgegangenen 34,7 ccm Gas reines Kohlenoxyd darstellen.

Hierauf geht man zur eudiometrischen Analyse über. 10 ccm Gas werden in einem Eudiometer über der Quecksilberwanne mit 11 ccm reinem Sauerstoff vermischt. Nun läßt man bei einem Gesamtvolumen von 21 ccm zwischen den beiden Platinfäden im Eudiometer einige elektrische Funken überspringen. Infolge davon sieht man das Quecksilber im Apparat steigen. Eine Ablesung, nachdem wieder Abkühlung eingetreten ist, ergibt 16 ccm, es hat also eine Contraction von 5 ccm stattgefunden. Einführung von einer Kalipastille und einigen Tropfen Wasser verursacht eine Absorption von 10 ccm, und nach Zusatz von Pyrogallol ist überhaupt kein Gas mehr vorhanden.

Aus dieser Analyse ergibt sich:

1. daß das Volumen der während der eudiometrischen Verbrennung gebildeten Kohlensäure der Menge der Gasmischung gleich ist,

2. daß die Contraction, welche das zu untersuchende Gasgemenge und der Sauerstoff nach der Explosion erfährt, gleich der Hälfte des verbrannten Gases ist,

3. daß das zur Verbrennung des zu analysierenden Gases nötige Sauerstoffvolumen halb so groß ist wie dasjenige des Gases.

Bezeichnet man das Volumen des unbekannten Gases mit A, das zu seiner eudiometrischen Verbrennung erforderliche O_2-Volumen mit B, die Contraction des Volumens nach dieser Operation mit C und ist F die Menge der gebildeten Kohlensäure, so kann man nach der ausgeführten Analyse folgende Gleichungen aufstellen:

$$B = \frac{A}{2}; \quad C = \frac{A}{2}; \quad F = A.$$

Die Versuchsergebnisse stimmen genau mit den volumetrischen Verhältnissen überein, die durch die eudiometrische Gleichung des Kohlenoxyds versinnbildlicht sind[1]).

Die in dem oben beschriebenen Versuche entwickelten Gase enthalten also Kohlenoxyd. Andererseits kann man auch auf analoge Weise die Natur des in der Kalilauge[2]) löslichen Gases feststellen. Der weiße Niederschlag, der mit Barytwasser entsteht, macht es wahrscheinlich, daß wir es mit Kohlensäure zu tun haben. Was nun die in Wasser löslichen Dämpfe betrifft, so ist es leicht, sie als Formalindämpfe zu identifizieren, da sie die Färbung des Fuchsinbisulfits und die Trillatsche Reaktion im Waschwasser der rohen Gase bewirken.

Versuch 2.

Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf gelöste Lävulose bei 20° und im Vakuum.

In einem Apparat, der mit dem vorher beschriebenen identisch ist, setzt man 25 ccm einer reinen, 3%igen Lävuloselösung im Vakuum bei 10 bis 20° ultravioletten Strahlen aus. Während einer 24stündigen Bestrahlung gewinnt man ungefähr 15 ccm Gas. Die Analyse an einer Probenahme von 11 ccm ergibt 0,5 ccm in Wasser lösliches Gas, vermischt mit Formaldehyddämpfen, 0,6 ccm in Kalilauge lösliche Kohlensäure und 9,9 ccm reines Kohlenoxyd.

Dieser Versuch liefert den Beweis, daß die wässerigen Lävuloselösungen unter der Einwirkung von ultravioletten Strahlen bei 20° ebenso wie bei 70° abgebaut werden, nur daß ein Unterschied in der Schnelligkeit der Reaktion besteht.

Versuch 4.

Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf gelöste Lävulose bei Anwesenheit von Luft.

In dieser Versuchsreihe wollten wir uns über die Bedeutung des Luftsauerstoffs bei den Spaltungsprozessen des d-Fructosemoleküls klar werden. 8%ige Lävuloselösungen werden in demselben bei den früheren Versuchen benutzten Apparat bestrahlt, ohne daß aber vorher der Quarzkolben evakuiert worden war.

Unter diesen Bedingungen, bei niedriger Temperatur, bei ca. 20°, beobachtete man keine Gasentwicklung während einer 48stündigen Bestrahlung. Dagegen entstehen bei 50° Gasbläschen. Im Vergleich jedoch

[1]) Marcellin Berthelot, Gasanalyse.

[2]) Das Waschen der rohen Gase mit Kalilauge muß sehr schnell ausgeführt werden, denn das Kohlenoxyd löst sich langsam, sogar in der Kälte, in diesen Lösungen unter Bildung von Alkaliformiaten auf.

zu dem Verhalten bei denselben Bedingungen unter Luftabschluß ist die Gasentwicklung ganz wesentlich geringer. Wir konnten Kohlenoxyd in dem Gemisch von Gasen und Luft nach 2 Tagen in der Quecksilberglocke nachweisen. Erwähnt sei noch, daß in unseren Versuchen bei Anwesenheit von Luft immer, sowohl bei 20° wie bei 50°, Formaldehyd unter den Zerfallsprodukten der Lävulose gefunden wurde, was übrigens mit unseren ersten Erfahrungen der Bestrahlungen von Lösungen im offenen Gefäß übereinstimmt.

Versuch 5.

Vergleich der Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf Lävulose im Vakuum bei 70° in einem Quarz- und in einem Glaskolben.

Zwei Apparate, die in einem Fall aus einem kleinen Quarzkolben, im anderen aus einem Kolben aus böhmischem Glas bestehen, werden durch einen Kautschukstopfen, der ein U-förmiges Ableitungsrohr trägt, mit zwei Quecksilberwannen verbunden, die wie in unseren früheren Versuchen angeordnet sind. Bestrahlt werden 25 ccm 8%ige Lävuloselösung.

Ist das Vakuum in beiden Kolben hergestellt, deren hermetischer Verschluß durch einen Kautschukring um den Hals und Pfropfen gesichert ist, so bringt man sie in gleiche Lage zwischen zwei parallel aufgestellte, mit ihrer gewöhnlichen Stärke brennende Lampen.

Unter diesen Versuchsbedingungen steigt die Temperatur schnell auf 70° an, und gleich von Anfang der Bestrahlung sieht man in der Lösung im Quarzkolben, wie sich Gase zu entwickeln beginnen. Erst nach 8 Stunden sind vereinzelte Gasbläschen in derjenigen im Glaskolben sichtbar. Wird der Versuch in der 24. Stunde abgebrochen, so betragen die Gasvolumina 33 ccm in dem bestrahlten Quarzkolben, 4 ccm im Glaskolben.

Die qualitative Analyse dieser beiden Gasmengen ergibt in beiden Fällen Formaldehyd, Kohlensäure und Kohlenoxyd. Dieser vergleichende Versuch lehrt, daß Kohlenoxyd- und Formaldehydbildung aus Lävulose hauptsächlich durch Einwirkung von ultravioletten Strahlen zustande kommt, deren Wellenlänge weniger als 3021° beträgt. Bei Bestrahlungen mit größerer Wellenlänge vollzieht sich die Zerlegung in weitaus schwächerem Grade.

VII. Nebenprodukte des Lävulosezerfalls durch ultraviolette Strahlen.

Unter den Körpern, die sich während der Einwirkung von ultravioletten Licht auf Lävulose bei Temperaturen zwischen

10 und 70° im luftleeren oder lufterfüllten Raume bildeten, haben wir Formaldehyd, Kohlensäure und Kohlenoxyd gefunden.

In den bei 60° im Vakuum ausgeführten Versuchen haben wir neben diesen drei Stoffen noch Methylalkohol nachweisen können. Zu diesem Behufe unterwirft man die bestrahlte Lösung einer Wasserdampfdestillation zur Austreibung aller flüchtigen Gebilde. Das auf diese Weise erhaltene Destillat enthält Formaldehyd, den wir durch die Rosanilinbisulfitprobe wie durch die Trillatsche Reaktion feststellen konnten. Zur Entfernung dieses Methanals genügt es, die Lösung mit der gleichen Menge Natriumbisulfit von 36° B zu mischen und von neuem zu destillieren. Die Verbindung von Formaldehyd mit Natriumbisulfit ist nicht flüchtig und das Destillat weist keine der Aldehydreaktionen auf. Zwecks Oxydation wird sie mit einer Mischung von Kaliumbichromat und Schwefelsäure behandelt[1]) Durch Destillation ergibt sich eine Formaldehyd enthaltende Flüssigkeit, die ein Oxydationsprodukt des in der bestrahlten Lösung sich vorher befindenden Methylalkohols ist. Zur Untersuchung der nicht flüchtigen Bestandteile der Lävulose im Versuch ist es nötig, den Überschuß dieser Verbindung, die durch die ultravioletten Strahlen noch nicht umgewandelt ist, auszutreiben.

In einigen Versuchen wurde die belichtete Lösung nach Konzentration im Vakuum bei niedriger Temperatur bis zur Sirupdicke mit obergäriger Bäckerhefe versetzt. Nach Ablauf einiger Stunden, bei einer Temperatur von 36°, war die ganze d-Fructose vergoren. Um sich von ihrem vollständigen Verschwinden zu vergewissern, setzte man eine Probe von 5 ccm der Lösung mit einigen Tropfen Phenylhydrazin und 50%iger Essigsäure 1 Stunde auf das Wasserbad bei 100°. Das Ausbleiben von Glucosazonbildung war der Beweis der gänzlichen Vergärung der Lävulose. Wir haben dann in den so bereiteten Lösungen auf andere Aldehyde, die aus dem Zerfall des Zuckermoleküls resultieren, gefahndet. Diese Lösungen reduzieren stark die Fehlingsche Lösung in der Hitze. Nach Neutralisierung mit Calciumcarbonat haben wir die Wirkung von Phenylhydrazinacetat an ihnen ausgeprobt. 50 ccm Lösung werden

[1]) Man stellt die Chromsäuremischung her, indem man 37 g gepulvertes Kaliumbichromat in 35 ccm destilliertem Wasser, dem 30 ccm Schwefelsäure von 66° B zugesetzt sind, auflöst.

mit $^1/_2$ ccm Phenylhydrazin und $^1/_2$ ccm Essigsäure von 50% versetzt. Diese Mischung läßt man 1 Stunde auf dem Wasserbade kochen und nachher langsam abkühlen. Man erhält dann einen krystallinischen Niederschlag, den man durch Filtration auf gehärtetem Papierfilter von der Lösung abtrennt. Nach wiederholtem Auswaschen mit kaltem Wasser löst sich das krystallinische Pulver in kochendem Wasser auf, aus dem es durch plötzliche Abkühlung niedergeschlagen wird. Wiederholt man die Fällung mehrere Male, so erhält man schließlich ein Gemisch von gelben, in heißem Wasser löslichen Krystallen. Nach erfolgter Trocknung bestimmt man ihren Schmelzpunkt nach Bertrands Methode auf dem Maquenne-Block. In anderen Versuchen haben wir auf die Hefewirkung verzichtet und direkt die bestrahlten Lävuloselösungen mit Phenylhydrazinacetat behandelt, nachdem sie durch Calciumcarbonat neutralisiert und bis zur Sirupkonsistenz verdampft worden waren. Man bestimmt vorher an einer Probenahme die nötige Menge Phenylhydrazinacetat, um das gesamte Glucosazon, das sich aus überschüssiger Lävulose bilden kann, zu erhalten. 50 ccm Lösung fügt man zu 2 ccm Phenylhydrazin und 2 ccm 50%ige Essigsäure hinzu. Diese Mischung wird 1 Stunde auf dem Wasserbade gekocht, dann langsam abgekühlt, wieder auf das Wasserbad bei 100° gebracht und heiß über gewöhnlichem Filter abfiltriert. Die filtrierte Flüssigkeit fällt durch Abkühlung aus. Zusatz der heißen Waschwässer von den auf dem Filter restierenden Krystallen und hierauf folgende wiederholte Reinigung durch Filtration in der Wärme und Erkalten der Lösungen. Es resultiert wie im vorigen Falle ein Gemisch von gelben Krystallen, die in heißem Wasser vollständig löslich sind. Die unlöslichen werden nach mehreren Waschungen mit kaltem destillierten Wasser, dann mit auf sein Volumen verdünnten Aceton und mit kaltem, reinem Methyalkohol im Brutschrank bei 50° getrocknet. Die charakteristische Gestalt dieser Krystalle und ihre Schmelzpunktbestimmung (230 bis 232°) weisen darauf hin, daß sie aus reinem Glucosazon bestehen.

Unsere Untersuchung des auf die eine oder die andere der beiden geschilderten Methoden gebildeten Hydrazinverbindungen führte nicht zur Charakteriserung eines oder mehrerer Körper, die bei dem Zerfall des d-Fructosemoleküls entstanden

sind. Durch fraktionierte Krystallisationen im Wasser und durch Anwendung der üblichen Lösungsmittel (Alkohol, Äther, Aceton usw.) ist es uns nicht gelungen, Produkte mit physikalischen Konstanten zu isolieren. Die Ursache dieses Mißerfolges, bei den Versuchen mit Phenylhydrazin zu definierten chemischen Verbindungen zu gelangen, ist wohl darin begründet, daß gleichzeitig während der Bestrahlung eine Reihe von Körpern von Aldehyd- oder Säurenatur sich bilden, die aufeinander reagieren. In der Tat muß die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Zucker mit 6 C-Atomen, wie die Lävulose, ein außerordentlich komplizierter Vorgang sein. Wir haben schon in unserer Einleitung erörtert, wie verschiedenartig der Einfluß dieser und der sichtbaren Lichtstrahlen sein kann. Es ergibt sich eine ganze Kette von Reaktionen — Oxydation, Hydrolyse, Kondensation, Polymerisation, unter Bildung von zahlreichen Verbindungen, die um so eher sich gegenseitig beeinflussen können, als sie alle in statu nascendi sich befinden. Nur die gasförmigen oder flüchtigen Verbindungen können dem Chaos von Reaktionen entzogen und relativ leicht quantitativ bestimmt werden. Was die Vielseitigkeit der Wirkung von ultravioletten Strahlen auf organische Verbindungen bei ziemlich niedrigen Temperaturen betrifft, so könnte man sie der Hitzewirkung auf Körper bei trockener Destillation an die Seite stellen. Bei diesem Verfahren ist es leicht, die Gesamtheit der im Destillat vorhandenen Gebilde zu identifizieren, denn sie sind von der hochgradig erwärmten Masse getrennt, in der alle gebildeten Verbindungen aufeinander reagieren, so daß schließlich ein Rückstand resultiert, der zu analysieren fast unmöglich ist. Ähnlich verhält es sich mit einer Zuckerlösung, die ultraviolettem Licht ausgesetzt wird, wo die durch die nascierenden Körper verursachten chemischen Vorgänge noch durch die Bestrahlung an Intensität gewinnen. Man wird die ganze Schwierigkeit der Bestimmung von den in den belichteten Lösungen verbleibenden Stoffen noch besser würdigen, wenn man bedenkt, daß die Absorption der Flüssigkeit gegenüber den von der Quarzlampe ausgesandten Strahlen Schwankungen unterworfen ist und infolgedessen die chemischen Prozesse, die an diese Bestrahlung geknüpft sind, ebenfalls einen unregelmäßigen Verlauf zeigen.

Setzt man eine reine 9%ige Lävuloselösung im luftleeren Raume bei 20° ultravioletten Strahlen aus, so entwickeln sich 15 ccm Gas. Die Gasbildung nimmt an Schnelligkeit allmählich ab, um schließlich gleich Null zu werden. Wie oben ausgeführt, findet man während dieser Bestrahlung Formaldehyd, Kohlenoxyd und Kohlensäure. Berechnet man die wahre Acidität der Lösung durch ihre gesteigerte elektrische Leitfähigkeit, so findet man ihren Wert K zu Anfang der Belichtung $= 103{,}10^{-6}$ und am Schluß $= 198{,}10^{-6}$. In allen Versuchen konnte die Bildung saurer Körper nachgewiesen werden. Sie ist eine Funktion der Temperatur, der Einwirkungszeit und der Natur der reagierenden Strahlen und ist ein wichtiges Moment für die Beurteilung des Zerfalls der Lävulose durch die ultravioletten Strahlen der Quarzlampe.

Wir haben den obigen Versuch sehr oft bei verschieden langer Einwirkungsdauer wiederholt. Wir konnten dabei beobachten, daß die Aciditätsbildung regelmäßig bis zu einem Maximum vor sich geht und in etwa der 50. Versuchsstunde konstant bleibt. In der Lösung vollzieht sich dann eine tiefgehende Veränderung, die durch Auftreten einer immer intensiver werdenden Gelbfärbung äußerlich kenntlich wird.

Was bedeuten also diese beiden experimentellen Tatsachen: Aufhören der Gasentwicklung und weiter der Bildung von sauren Verbindungen? Wohl nichts anderes, als daß während der Einwirkung der von dem Quecksilber im Vakuum auf die wässerige Lävuloselösung ausgesandten Strahlen ein Durch- und Übereinander von Prozessen vorliegt. Einer der ersten ist wahrscheinlich die Spaltung des Moleküls in der Nachbarschaft des Carbonyls. Vermutlich entspricht dieser primären Zerlegung der zur Bildung von Formaldehyd und Kohlenoxyd führende Abbauprozeß. Parallel damit geht, so ist man logischerweise berechtigt anzunehmen, die Bildung der sauren Verbindungen, in denen die Zahl der Kohlenstoffatome immer mehr abnimmt, da man ja unter den Reaktionsprodukten Kohlensäure, die Endstufe des Zerfalls der Kontrollösungen, feststellen kann.

In Wirklichkeit nehmen diese Vorgänge, wie schon auseinandergesetzt, durch sekundäre Reaktionen der durch die ultravioletten Strahlen entstehenden Körper aufeinander einen

verworrenen Charakter an; es resultieren Gebilde von mehr oder weniger komplizierter molekularer Struktur. Die weitere Reaktion, die die Aufspaltung des d-Fructosemoleküls oder des ersten Oxydationsproduktes, des Osons, zum Ausgangspunkt hat, wird fortan von ihrer Bahn abgelenkt. Theoretisch könnte man sagen, die d-Fructose zerfällt nach Übergang in das Osonstadium in unseren Versuchen in Formaldehyd, Kohlenoxyd und Trioxybuttersäure, welch letztere Glykol, Glykolsäure, Glykolaldehyd, Glyoxal, Glyoxalsäure, Oxalsäure, Kohlensäure liefert. Von diesen möglichen Reaktionen haben wir nur die gasförmigen oder flüchtigen Stufen zu fassen vermocht. Der Umstand, daß die Absorptionsfähigkeit unserer bestrahlten Lösungen während der Einwirkungszeit schwankt, legt uns die Vermutung nahe, daß an Stelle der oben geschilderten Reaktion eine oder mehrere andere Zerlegungsmodi treten können. Die gehemmte Gasentwicklung, dann der Stillstand in der Bildung saurer Körper und schließlich das Auftreten von gefärbten Stoffen, das alles sind Erscheinungen, die für unsere Auffassung der gesamten Wirkungen von ultravioletten Strahlen auf Lävulose sprechen.

J. Bielecki und V. Henri[1]) haben in einer umfangreichen Versuchsreihe die quantitative Absorption von ultravioletten Strahlen durch organische Stoffe im reinen oder gelösten Zustande studiert. Sie konstatierten, daß die Absorption der einbasischen Säuren sehr stark ist, ungefähr 2000 mal stärker als z. B. diejenige des Methylalkohols. Bei den zweibasischen Säuren, wenn die zwei Carboxylgruppen direkt miteinander verbunden sind (Oxalsäure), ist die Absorption außerordentlich intensiv, für die kürzesten Strahlen ungefähr 15 mal stärker als bei den einbasischen, beträgt also das 30000 fache derjenigen des Methylalkohols. Wenn dagegen die COOH-Gruppen durch eine oder mehrere CH_2-Gruppen getrennt sind, erweist sich die Absorption nur etwas stärker wie die der einbasischen Säuren.

Die Schlußergebnisse dieser Arbeit, die auch die große Absorptionsfähigkeit der sauren Körper dartut, liefern uns die Erklärung für die ansteigende Absorption in unseren Lävuloselösungen während der Bestrahlung. Ursache dieser Erscheinung ist zum weitaus größten Teil das Auftreten von Carbonylgruppen.

---

[1]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 19. August 1912.

Gleich zu Beginn der Einwirkung von ultravioletten Strahlen werden die gebildeten Reaktionen in ihrem Verlaufe modifiziert, so daß wir vor einer schier unüberwindlichen experimentellen Schwierigkeit stehen, die komplizierten Verhältnisse zu verfolgen, da die äußerst labile Zusammensetzung der bestrahlten Lösung selbst das sie durchdringende Licht quantitativ wie qualitativ verändert.

Allgemeine Schlußsätze.

Setzt man reine wässerige Lävuloselösungen der Wirkung ultravioletter Strahlen aus, die von einer Quarzlampe bei einer Temperatur zwischen 20 und 70° bei Luftabschluß oder im Freien ausgesandt werden, so erfährt das Molekül dieses Zuckers einen tiefgreifenden Abbau, der zur Bildung von Formaldehyd und Kohlenoxyd führt[1]).

Nach uns haben D. Berthelot und Gaudechon[2]) die Bildung derselben Verbindungen bei analoger Bestrahlung von $10\,^0/_0$iger Lävuloselösung bei 80 bis 90° beobachtet.

Im Verlaufe unserer Darlegungen haben wir auf die biologische Bedeutung unserer Versuche in bezug auf die photochemische Bildung des Formaldehyds während der Zersetzung einer Hexose verwiesen.

Der Nachweis von Kohlenoxyd unter denselben Versuchsbedingungen ist auch bemerkenswert. Nach der Auffassung von M. Berthelot würde dieses Gas die Anfangsstufe des Kohlenstoffes in der natürlichen Synthese der ternären Substanzen im pflanzlichen Organismus darstellen. Dieser Forscher sagte schon im Jahre 1864: „Unter der Mitwirkung des Sonnenlichtes und der grünen Pflanzenteile werden die Kohlensäure und das Wasser zersetzt. Ihre Reduktion ist eine derartige, daß sich ein dem der Kohlensäure gleiches Sauerstoffvolumen abspaltet. Das ist eine experimentell gesicherte Tatsache, die man so deuten kann, daß durch die pflanzliche Atmung das Wasser in Wasserstoff, die Kohlensäure in Kohlenoxyd umgewandelt werden. Die auf diese Weise reduzierten Körper reagieren in statu nascendi

[1]) Bierry, V. Henri, A. Ranc, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 25. Juli 1910.

[2]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 1. August 1910.

aufeinander und erzeugen alle natürlichen Verbindungen“[1]). M. Berthelot erteilte also im Geiste den beiden Reduktionsprodukten der Kohlensäure und des Wassers eine überwiegende Rolle bei allen bei der Pflanze sich abspielenden Synthesen. Diese Ansichten haben der Hauptsache nach allgemeine Bestätigung gefunden. In Einzelheiten sind sie in dem Maße, wie sich unsere Kenntnisse über den Bau der Zuckerstoffe erweitert und vertieft haben, genauer geworden. Auch die Theorie Baeyers sieht ein Kohlenoxydstadium voraus; weiter wird diese Auffassung durch unsere Versuche gestützt, in denen wir das Kohlenoxyd als photochemisches Zerfallsprodukt eines Zuckermoleküls fanden. Das Kohlenoxydgas kann unserer Meinung nach von allererster Bedeutung für die Bildung organischer Stoffe sein, die, von Zucker abgesehen, in den Pflanzenzellen enthalten sind, da es mit erstaunlicher Leichtigkeit mit den meisten organischen Substanzen Verbindungen eingeht[2]).

Eine analoge Rolle kommt möglicherweise den Säuren zu, die während der photochemischen Zuckerspaltung gebildet werden. Ganz allgemein liefern die Kohlenhydrate während ihres Abbaues unter dem Einfluß der ultravioletten Strahlen der Quarzlampe Körper von saurem Charakter. Wir selber konnten dies bei den mehrwertigen Alkoholen, den Hexosen und Polyosen beobachten. J. Bielecki und Wurmser[3]) haben es auch bei den Polysacchariden konstatiert. Diese Autoren haben an Stärke[4]) die Acidität ihrer Versuchslösung mit den beiden Methoden der elektrischen Leitfähigkeit und der elektromotorischen Kräfte verfolgt. Bei einer Lampe von 110 Volt und Bestrahlungsdauer von 255 Stunden betrug die Leitfähigkeit am Anfang $10 \cdot 10^{-6}$, am Schluß $257 \cdot 10^{-6}$.

---

[1]) Boussingault schreibt auch: „Jede der beiden Blattseiten trägt zur Aufspeicherung des Kohlenstoffes oder des Kohlenoxyds und des Wasserstoffes, die aus dem gleichzeitigen Zerfall von CO_2 und H_2O resultieren, im pflanzlichen Organismus bei.“

[2]) In dem Buche von M. Berthelot, Lehre von den allgemeinen Methoden der chemisch-organischen Synthese, 1864, sind zwei Kapitel dem Studium der Kohlenoxydverbindungen gewidmet.

[3]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 28. Mai 1912; diese Zeitschr. 43, 154, 1912.

[4]) Kartoffelstärke, die durch wiederholtes Auflösen und Erfrieren frei von Mineralstoffen ist.

Die Wasserstoffionenkonzentration schwankte in derselben Zeit zwischen $10^{-5,34}$ und $10^{-2,93}$. Dieselbe Acidität wird bei einer 500-Volt-Lampe in 6 Stunden erreicht.

Die folgende Tabelle veranschaulicht den Verlauf dieser Reaktion, die zuerst schnell, dann allmählich langsamer wird.

Dauer Std.	Leitfähigkeit $\times 10^{-6}$	H-Ionen-konzentration
0	10	$10^{-5,34}$
1	38	$10^{-4,96}$
2	54	$10^{-4,90}$
6	111	—
22	166	$10^{-3,64}$
48	195	$10^{-3,28}$
70	240	$10^{-3,15}$
115	257	$10^{-2,93}$
255	257	$10^{-2,93}$

Zur Erzeugung der in den Pflanzen vorkommenden kompliziert gebauten Körper werden diese Säuren photochemischen Ursprungs sicherlich herangezogen. Diese Hypothese würde durch die Versuche der Kohlenhydratsynthese durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf die Calciumsalze organischer Säuren, die wir schon eingangs besprochen haben, sowie durch die Versuche von Neuberg[1]) über die Elektrolysen in der Zuckerreihe Stützpunkte finden.

Letzterer hat durch Elektrolyse von folgenden Säuren: d-Glucon-, l-Arabon-, l-Erythronsäure, i-Glycerin-, Glykolsäure die entsprechenden Körper d-Arabinose, l-Erythrose, i-Glycerinaldehyd, Glykolaldehyd erhalten, was sich in jedem Falle durch eine Verkürzung der Kohlenwasserstoffkette kundgibt.

Diese Versuche zeigen deutlich, daß Säuren der Ausgangspunkt von wichtigen Reaktionen in der Biochemie der Pflanzen sein können[2]).

Wir haben nachdrücklich die Schwierigkeit hervorgehoben, die sich bei Zuckerlösungen der Bestimmung der unter Ein-

[1]) C. Neuberg, Diese Zeitschr. 7, 2, 1908.

[2]) Nach der Theorie der Chlorophyllassimilation von Liebig und Ballo, in der Formaldehyd absolut keine Rolle spielt, stellen Oxalsäure und Ameisensäure die erste Reduktionsstufe der Kohlensäure dar, die unter Bildung von Glykol-, Bernstein- und Weinsteinsäure sich vollzieht. Diese Kondensationsreihe würde dann durch weitere Reduktion in der Gluconsäurebildung ihren Abschluß finden.

wirkung von ultravioletten Strahlen gebildeten Körper mit Aldehyd- und Säurecharakter entgegensetzt. Wir konnten zwar ihre Existenz en bloc nachweisen, sie einzeln aber nicht identifizieren.

Zusammenfassend können wir sagen: In den beschriebenen Versuchsbedingungen wird das Molekül der d-Fructose gespalten unter Bildung von Formaldehyd, Kohlenoxyd, Kohlensäure, Methylalkohol und Körpern von Aldehyd- und Säurenatur. Zum erstenmal ist, ohne Fermente und ohne chemische Agenzien, ein derartiger Abbau dieses Zuckers verwirklicht worden.

Über die Adsorption des Traubenzuckers. II.

von

Peter Rona und Koloman von Tóth.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 2. Mai 1914.)

In einer früheren Arbeit hatten P. Rona und L. Michaelis[1]) den Nachweis geführt, daß das Verschwinden des Traubenzuckers beim Schütteln von dessen (neutraler oder schwach saurer) wässeriger Lösung mit Tierkohle auf einer echten Adsorption beruht. Ferner wurde nachgewiesen, daß es gelingt, durch andere gut adsorbierbare Stoffe, wie Essigsäure, Aceton, den Zucker von der Kohlenoberfläche zu verdrängen. Vom theoretischen wie auch vom praktischen Gesichtspunkte aus waren diese Befunde von Interesse. Nach der Theorie von Gibbs-Freundlich ist ein Stoff in wässeriger Lösung adsorbierbar, wenn er die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzt. Im allgemeinen ergibt sich, daß Stoffe, welche die Oberflächenspannung des Wassers gegen Luft stark erniedrigen, aus der wässerigen Lösung auch von festen Körpern stark adsorbiert werden. Beim Traubenzucker gehen beide Vorgänge jedoch nicht parallel, denn Traubenzucker beeinflußt die Oberflächenspannung des Wassers gegen Luft nicht, dennoch wird er von Kohle adsorbiert. In diesem Falle ist die Annahme berechtigt, daß der Zucker die Oberflächenspannung des Wassers gegen Kohle erniedrigt. Leider besitzen wir kein Mittel, die Oberflächenspannung des Wassers gegen Kohle zu messen.

Die Tatsache, daß der Traubenzucker von der Kohlenfläche durch andere Adsorptionsmittel verdrängt werden kann,

[1]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. **16**, 489, 1909.

ist auch in methodischer Hinsicht von Wichtigkeit. Bei der Klärung zuckerhaltiger Lösungen durch Tierkohle wird man diese Tatsache beachten müssen, wenn man Zuckerverluste vermeiden will. Auf diese Nutzanwendung ist bereits in der ersten Mitteilung hingewiesen worden[1]).

Da nicht nur Essigsäure, sondern auch andere Säuren die Adsorption des Zuckers an Kohle vermindern, war es von Interesse zu untersuchen, ob und wieweit die Säure als solche, resp. die H'-Konzentration der Lösung die Verdrängung des Zuckers von der Kohlenoberfläche bewirkt, und wieweit die undissoziierten Moleküle dabei beteiligt sind. Leicht konnte dies bei der Essigsäure auf folgende Weise entschieden werden.

Eine wässerige Traubenzuckerlösung von 0,82% wurde mit 5 g Tierkohle (Carbo sanguis pro analysi, Merck) in 100 ccm Wasser bis zum Eintritt des Adsorptionsgleichgewichtes geschüttelt. In Parallelversuchen wurde dieselbe Zuckermenge mit derselben Kohlenmenge in einer Probe mit Essigsäure zu 0,8 n, in einer zweiten mit derselben Essigsäuremenge + Natriumacetat zu 0,4 n, in einer dritten mit derselben Essigsäuremenge + HCl zu 0,05 n geschüttelt.

Die Anordnung und das Ergebnis der Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

	Zuckerlösung 0,09 n ccm	Essigsäure ca. 16 n ccm	Natriumacetat 2 n ccm	HCl 1 n ccm	Dest. Wasser ccm	Traubenzucker vor dem Schütteln %	Traubenzucker nach dem Schütteln %	H-Ionenkonzentration vor dem Schütteln elektr. gemessen	H-Ionenkonzentration nach dem Schütteln, elektr. gemessen
1	50	5	—	—	45	0,80	0,77	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	$3{,}5 \cdot 10^{-3}$
2	50	—	20	—	30	0,80	0,39	$3{,}1 \cdot 10^{-8}$	$4{,}2 \cdot 10^{-8}$
3	50	—	—	5	45	0,80	0,38	$4{,}0 \cdot 10^{-2}$	$2{,}2 \cdot 10^{-2}$
4	50	5	20	—	25	0,80	0,79	$5{,}4 \cdot 10^{-5}$	$4{,}5 \cdot 10^{-5}$
5	50	5	—	5	40	0,80	0,78	$4{,}2 \cdot 10^{-2}$	$2{,}8 \cdot 10^{-2}$
6	50	—	—	—	50	0,80	0,39	—	$8{,}5 \cdot 10^{-7}$

Der Versuch zeigt klar, daß die Verdrängung des Traubenzuckers nur den undissoziierten Essigsäuremolekeln zugeschrieben

[1]) Vgl. auch I. Bang und G. Bohmannsson, Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**, 443, 1909.

werden kann. Erniedrigt man nämlich die H-Ionenkonzentration der Essigsäurelösung durch Zufügung von Natriumacetat von $4{,}5 \cdot 10^{-3}$ auf $5{,}4 \cdot 10^{-5}$, so ändert sich nichts an der verdrängten Zuckermenge gegen die in der reinen Essigsäurelösung. Ebenso ist die Verdrängung gleich, wenn zu der Essigsäurelösung Salzsäure zugefügt worden ist, trotz der Erhöhung der H-Ionenkonzentration von $4{,}5 \cdot 10^{-3}$ auf $4{,}2 \cdot 10^{-2}$. Vermehrung der Acetationen wie auch der H-Ionen ist demnach ohne Einfluß auf die Zuckerverdrängung. Kontrollversuche zeigen dementsprechend, daß die angewandten Natriumacetat- und Salzsäuremengen die Adsorbierbarkeit des Zuckers nicht oder in analytisch kaum nachweisbarer Weise beeinflußt haben. Die Essigsäure kann praktisch als ganz undissoziiert angesehen und die Konzentration der undissoziierten Säure der gesamten Essigsäurekonzentration gleich gesetzt werden. Diese ist in den Versuchen Nr. 1, 4, 5 konstant, und ihr entspricht die gleichgroße Verdrängung in den entsprechenden Versuchen.

Die Verdrängung des Traubenzuckers wird demnach von den undissoziierten Essigsäuremolekeln bewirkt, gemäß der mechanischen Adsorbierbarkeit der letzteren. In Übereinstimmung hiermit geht die verdrängende Wirkung anderer stark oberflächenaktiver Säuren parallel mit dem Grad ihrer Adsorbierbarkeit. Vergleicht man z. B. die Zuckerverdrängung bei Anwendung von Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure bei derselben oder einer naheliegenden H-Ionenkonzentration, so ist die Verdrängung um so größer, je stärker die betreffende Säure selbst von der Kohle adsorbiert wird.

Tabelle II.

Essigsäure		Propionsäure		Buttersäure		Isobuttersäure		Traubenzucker in %		H-Ionenkonzentration, elektrometrisch gemessen		Bemerkung
Normalität		Normalität		Normalität		Normalität						
vor d. Schütteln	nach d. Schütteln	vor d. Schütteln	nach d. Schütteln	vor d. Schütteln	nach d. Schütteln	vor d. Schütteln	nach d. Schütteln	vor d. Schütteln	nach d. Schütteln	vor d. Schütteln	nach d. Schütteln	
0,15	0,087	—	—	—	—	—	—	0,90	0,57	$2{,}3 \cdot 10^{-3}$	$1{,}0 \cdot 10^{-3}$	In der reinen Zuckerlösung (0,9 %) wurde nach dem Schütteln wiedergefunden: 0,84 %.
0,29	0,20	—	—	—	—	—	—	0,90	0,67	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	$1{,}9 \cdot 10^{-3}$	
—	—	0,106	0,034	—	—	—	—	0,90	0,62	$1{,}4 \cdot 10^{-2}$	$5{,}1 \cdot 10^{-4}$	
—	—	0,212	0,099	—	—	—	—	0,90	0,74	$4{,}6 \cdot 10^{-2}$	$1{,}0 \cdot 10^{-2}$	
—	—	—	—	0,096	0,010	—	—	0,90	0,68	$1{,}3 \cdot 10^{-2}$	$2{,}6 \cdot 10^{-4}$	
—	—	—	—	0,285	0,010	—	—	0,90	0,83	$1{,}9 \cdot 10^{-2}$	—	
—	—	—	—	—	—	0,048	0,005	0,90	0,55	$8{,}2 \cdot 10^{-4}$	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	
—	—	—	—	—	—	0,096	0,018	0,90	0,69	$1{,}1 \cdot 10^{-2}$	$3{,}0 \cdot 10^{-4}$	

Dies zeigt die vorstehende Tabelle II. In diesen Versuchen betrug die Gesamtmenge der Flüssigkeit 110 ccm, geschüttelt wurde mit 5 g Kohle.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die Verdrängung durch Essigsäure durchweg schwächer ist als die durch Propionsäure, und diese wieder schwächer als die durch Buttersäure und Isobuttersäure.

Hiermit in Übereinstimmung steht auch, daß die nur schwach absorbierbaren anorganischen Säuren, wie HCl, H_2SO_4, ungleich schwächer verdrängen als die obenerwähnten oberflächenaktiven Verbindungen[1]). Dies ist aus der folgenden Tabelle III ersichtlich. Geschüttelt wurde mit 5 g Kohle.

Tabelle III.

Traubenzucker 0,1 n ccm	Salzsäure 5 n ccm	Salzsäure 1 n ccm	Schwefelsäure 5 n ccm	Schwefelsäure 1 n ccm	Phosphorsäure 3 n ccm	Phosphorsäure 1 n ccm	Dest. Wasser ccm	Traubenzucker in % vor d. Schütteln	Traubenzucker in % nach d. Schütteln	Bemerkungen
50	20	—	—	—	—	—	30	0,90	0,51	In der reinen Zuckerlösung (0,90 %) wurde nach dem Schütteln gefunden: 0,34 % Traubenzucker.
50	—	20	—	—	—	—	30	0,90	0,40	
50	—	—	20	—	—	—	30	0,90	0,51	
50	—	—	—	20	—	—	30	0,90	0,43	
50	—	—	—	—	20	—	30	0,90	0,50	
50	—	—	—	—	—	6,5	43,5	0,90	0,42	

In jüngster Zeit hat Warburg[2]) interessante Beobachtungen über Hemmung der Oxalsäureverbrennung auf der Kohlenoberfläche durch indifferente Narkotica aus der Urethanreihe mitgeteilt.

Angeregt durch diese Untersuchungen haben wir nun geprüft, wieweit die Urethane die Adsorption des Traubenzuckers durch Kohle hemmen können. Die Versuche sind mit Methyl-, Äthyl-, Propyl- und Isobutylurethan ausgeführt. Die Anordnung der Versuche im einzelnen ist in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

[1]) Die Empfehlung der Salzsäure als Verdrängungsmittel von Bang und Bohmannsson (l. c.) statt der von Rona und Michaelis (l. c.) als zweckmäßig bezeichneten Essigsäure können wir daher nicht vorteilhaft finden.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. 155, 547, 1914.

Tabelle IV.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 100 ccm. Kohle 3 g.

	Traubenzucker in % vor dem Schütteln	Traubenzucker in % nach dem Schütteln	Adsorbierter Traubenzucker %	Urethan in Mol vor dem Schütteln
Methylurethan	0,87	0,60	31	0,043
Äthylurethan	0,87	0,71	18	0,043
Propylurethan	0,87	0,79	9	0,052
Butylurethan	0,87	0,84	3	0,043
Ohne Zusatz	0,87	0,56	35	—

Tabelle V.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 100 ccm. Kohle 3 g.

	Traubenzucker in % vor dem Schütteln	Traubenzucker in % nach dem Schütteln	Adsorbierter Traubenzucker %	Urethan in Mol vor dem Schütteln	Urethan in Mol nach dem Schütteln	Adsorbierte Urethanmenge %
Methylurethan	0,90	0,67	25,5	0,072	0,031	57,0
Äthylurethan	0,90	0,72	20,0	0,074	0,021	71,7
Propylurethan	0,90	0,83	7,8	0,070	0,009	87,0
Butylurethan	0,90	0,78	2,2	0,070	0,004	93,6
Ohne Zusatz	0,90	0,53	38,1	—	—	—

Tabelle VI.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 100 ccm. Kohle 4 g.

	Traubenzucker in % vor dem Schütteln	Traubenzucker in % nach dem Schütteln	Adsorbierte Zuckermenge %	Urethan in Mol vor dem Schütteln	Urethan in Mol nach dem Schütteln	Adsorbierte Urethanmenge %
Äthylurethan	0,94	0,63	32,9	0,108	0,029	73,2
Propylurethan	0,94	0,72	23,4	0,095	0,012	87,4
Butylurethan	0,94	0,81	13,8	0,081	0,008	90,2
Ohne Zusatz	0,94	0,46	51,0	—	—	—

Tabelle VII.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 100 ccm. Kohle 3 g.

	Traubenzucker in % vor dem Schütteln	Traubenzucker in % nach dem Schütteln	Adsorbierte Zuckermenge %	Urethan in Mol vor dem Schütteln
Methylurethan	0,62	0,45	27,4	0,048
Äthylurethan	0,62	0,47	24,1	0,048
Propylurethan	0,62	0,51	17,7	0,046
Butylurethan	0,62	0,56	9,6	0,048
Ohne Zusatz	0,62	0,36	41,9	—

Tabelle VIII.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 100 ccm. Kohle 5 g.

	Traubenzucker in % vor dem Schütteln	Traubenzucker in % nach dem Schütteln	Adsorbierte Zuckermenge %	Urethan in Mol vor dem Schütteln	Urethan in Mol nach dem Schütteln	Adsorbierte Urethanmenge %
Methylurethan . .	0,55	0,305	45,4	0,052	0,018	65,4
„ . .	0,55	0,35	36,7	0,102	0,037	63,7
„ . .	0,55	0,44	20,0	0,195	0,095	51,3
Äthylurethan . .	0,55	0,35	36,7	0,050	0,008	84,0
„ . .	0,55	0,44	20,0	0,096	0,026	80,9
„ . .	0,55	0,53	3,6	0,170	0,064	62,4
Ohne Zusatz . . .	0,55	0,23	58,1	—	—	—

Aus den mitgeteilten Versuchen ist ersichtlich, daß der Traubenzucker von der Kohlenoberfläche durch die stark oberflächenaktiven Urethane verdrängt wird, und zwar nach Maßgabe der Adsorbierbarkeit der einzelnen Urethane. Die Adsorbierbarkeit der Urethane nimmt von Methylurethan mit zunehmender Größe des Moleküls zu, entsprechend der Oberflächenspannung erniedrigenden Wirkung der einzelnen Urethane. Parallel mit diesen Eigenschaften geht die Fähigkeit der Zuckerverdrängung.

Hier mögen einige Untersuchungen über die die Oberflächenspannung erniedrigende Wirkung wie auch weitere Daten über die Adsorbierbarkeit der geprüften Urethane durch Kohle eingeschaltet werden. Für die relative Oberflächenspannung bei 18° (die des Wassers gleich 1 gesetzt), ergaben sich folgende Werte:

Für Methylurethan (0,1 n) = 0,9415
„ „ (0,2 n) = 0,9536
„ Äthylurethan (0,14 n) = 0,8943
„ Propylurethan (0,1 n) = 0,8150
„ Isobutylurethan (0,1 n) = 0,6265

Die Untersuchung wurde nach der Steighöhenmethode in der Weise, wie dies in der eingangs erwähnten Mitteilung genau geschildert ist, ausgeführt.

Betreffs der Adsorbierbarkeit der Urethane durch Kohle mögen außer den obigen noch die folgenden Untersuchungen mitgeteilt werden (Tabelle IX, X und XI).

Infolge der Flüchtigkeit der Urethane war die Bestimmung des N-Gehaltes ihrer wässerigen Lösung nach der Kjeldahl-Methode nicht gut durchführbar. Beim längeren Stehen (ca. 24 Stunden) der schwefelsauren Lösung unter zeitweiligem, gelindem Erwärmen erhielt man zwar oft gute, in mehreren Fällen jedoch auch hier um mehrere Prozente zu niedrige Werte. Befriedigende Werte werden erhalten, wenn die

wässerige Urethanlösung in einem Kolben mit vorgelegter titrierter H_2SO_4 zunächst mit Natronlauge in der Kälte zerlegt und das entstandene NH_3 mittels Dampfstroms in die Vorlage geleitet wird.

Tabelle IX.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 80 ccm. Kohle 4 g.

Urethan	Menge vor dem Schütteln Mol	Menge nach dem Schütteln Mol	Adsorbierte Menge Mol	Adsorbiert %
Methylurethan . .	0,102	0,037	0,064	63,7
Äthylurethan . . .	0,096	0,018	0,078	76,9
Propylurethan . .	0,098	0,018	0,080	81,3
Butylurethan . . .	0,084	0,005	0,079	94,1

Tabelle X.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 80 ccm. Kohle 4 g.

Urethan	Menge vor dem Schütteln Mol	Menge nach dem Schütteln Mol	Adsorbierte Menge Mol	Adsorbiert %
Methylurethan . .	0,085	0,034	0,051	60,0
Äthylurethan . . .	0,079	0,020	0,059	74,7
Propylurethan . .	0,087	0,009	0,078	89,7
Butylurethan . . .	0,087	0,002	0,085	97,7

Tabelle XI.

Gesamtmenge der Flüssigkeit 80 ccm. Kohle 4 g.

Urethan	Menge vor dem Schütteln Mol	Menge nach dem Schütteln Mol	Adsorbierte Menge Mol	Adsorbiert %
Methylurethan . .	0,054	0,009	0,045	83,4
„ . .	0,102	0,037	0,064	63,8
„ . .	0,203	0,093	0,110	45,8
Äthylurethan . . .	0,096	0,018	0,078	81,2
„ . . .	0,166	0,051	0,115	69,3

Es sei noch hervorgehoben, daß die Urethane entsprechend ihrer mechanischen Adsorbierbarkeit weder von Kaolin noch von Eisenhydroxyd adsorbiert werden. Dies ist eine wichtige Bestätigung der Annahme, daß Kaolin nur auf elektrochemischem und nicht auf mechanischem Wege adsorbieren kann. Selbst die äußerst stark oberflächenaktiven Stoffe wie Aceton oder Tributyrin werden durch Kaolin nicht adsorbiert.

Aus all diesen Versuchen ergibt sich, daß die Verdrängung des Traubenzuckers von der Oberfläche der Tierkohle nach Maßgabe der Oberflächenaktivität der betreffenden Stoffe erfolgt. Es war auch zu erwarten, daß die Verdrängung der Urethane durch Zucker nur schwach ausgeprägt sein wird, da der Traubenzucker im Vergleich zu den Urethanen von Kohle nur schwach adsorbiert wird. Das ist tatsächlich der Fall.

Wie die in dieser Richtung angestellten Versuche zeigen, war noch beim Methyl- und Äthylurethan bei der angewandten Zuckerkonzentration (0,05 bis 0,1 n) eine schwache Verdrängung der Urethane zu konstatieren; beim Propyl- und Butylurethan war, entsprechend der stärkeren Adsorbierbarkeit, eine analytisch nachweisbare Verdrängung durch den Zucker nicht vorhanden.

Die vorliegenden Versuche liefern ein Beispiel für eine „hemmende" Wirkung indifferenter Narkotica aus der Urethanreihe, die auf die mechanische Adsorbierbarkeit dieser Körper zurückgeführt werden muß. Man wird mit der Annahme wohl kaum fehlgehen, daß für manche sich im Organismus abspielenden Prozesse die in dieser Arbeit mitgeteilten Erscheinungen als Modell dienen können. Jedenfalls wird auch durch diese Versuche gezeigt[1]), daß neben der Lipoidlöslichkeit der entsprechenden Verbindungen ihrer die Oberflächenspannung erniedrigenden Wirkung die nötige Beachtung geschenkt werden muß.

[1]) Vgl. in dieser Richtung vor allem die Untersuchungen von J. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **105**, 555, 1904. Vgl. auch S. Loewe, Diese Zeitschr. **42**, 150, 1912.

Darstellung von Links- und Rechtszimtsäure durch asymmetrische Induktion.

Von

Emil Erlenmeyer.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Kaiserlichen Biologischen Anstalt zu Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 9. Mai 1914.)

Die weitere Verfolgung der Beobachtungen über induzierte molekulare Asymmetrie bei ungesättigten Verbindungen[1]) führte mich zu der Vermutung, daß die induzierende Wirkung einer optisch aktiven Substanz auf eine ungesättigte Verbindung durch gleichzeitige Energiezufuhr in Form von Wärme erhöht werden und daß es so gelingen könnte, die ungesättigte Verbindung in aktiver Form abzuscheiden und zu untersuchen. Ja, es schien mir nicht unwahrscheinlich, auf diesem Wege auch dann auf die ungesättigte Verbindung eine induzierende Wirkung ausüben zu können, wenn die zur Induktion benutzte Substanz gar nicht mit der zu induzierenden ungesättigten Verbindung vorher in chemische Verbindung tritt.

Die im folgenden mitgeteilte Untersuchung bestätigt die Richtigkeit meiner Vermutung. Bei der Schmelze von d-Weinsäure und Zimtsäure bei 168° wird ein Teil der Zimtsäure als solche schwach linksdrehend, ein anderer Teil tritt unter Bildung von Mono- und Dicinnamat der Weinsäure in das Molekül der Weinsäure ein. Da die aus den Cinnamaten durch vorsichtige Verseifung gewonnenen Zimtsäurepräparate sich durch ein hohes, bis über $[\alpha]_D = -20^0$ betragendes Drehungsvermögen auszeichnen, muß angenommen werden, daß die

[1]) Diese Zeitschr. 43, 445, 1912.

Zimtsäure bereits in molekular asymmetrischer, optisch aktiver Form in die Weinsäure eintritt.

Noch interessanter ist die Darstellung stark links- bzw. rechtsdrehender Zimtsäurepräparate neben den zugehörigen Dicinnamaten beim Verschmelzen von d- bzw. l-Weinsäure mit zwei Molekülen Zimtsäureanhydrid. Die bei dieser Reaktion freiwerdende Zimtsäure, die mit der Weinsäure in keinerlei Verbindung getreten ist, wies über $[\alpha]_D = -10^0$ betragende Drehwerte bei der Schmelze mit d-Weinsäure auf, während die mit Hilfe von l-Weinsäure dargestellten d-Zimtsäuren bisher noch etwas schwächer drehten.

Im 16. Abschnitt wird auf Grund der Analysen und der bei den aktiven Zimtsäurelösungen abgelesenen Drehungswinkel der einwandfreie Beweis geliefert, daß die festgestellte Aktivität tatsächlich eine neue, durch die Schmelze mit den aktiven Weinsäuren erworbene Eigenschaft der Zimtsäure vorstellt, die unter Bedingungen wieder verschwindet, unter denen die optische Aktivität bei Körpern mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen bestehen bleibt.

Experimenteller Teil.

Gemeinsam mit G. Hilgendorff und F. Landsberger.

Vor der Mitteilung der Resultate, die bei der gemeinsamen Schmelze von d-Weinsäure und Zimtsäure erhalten wurden, erscheint es wichtig, das Verhalten des in der gleichen Weise für sich ausgeführten Schmelzen von d-Weinsäure bzw. Zimtsäure anzuführen.

1. Schmelze der d-Weinsäure.

Durch Erhitzen für sich geht die Weinsäure nach den Angaben älterer Autoren[1]) bei Temperaturen, die ihren Schmelzpunkt (167 bis 170°) nicht erheblich überschreiten, in Säuren über, die als Metaweinsäure, Tartralsäure, Tartrelsäure beschrieben sind, die durch Kochen mit Wasser wieder in Weinsäure zurückverwandelt werden und die deshalb zum Teil als Weinsäureanhydride aufzufassen sind.

Um das Verhalten dieser bei der Weinsäureschmelze entstehenden Körper Äther gegenüber kennen zu lernen, wurden 20 g

[1]) Vgl. Meyer und Jacobsen, Seite 803.

Weinsäure geschmolzen und 30 Minuten lang bei 168 bis 170° gehalten. In Übereinstimmung mit den früheren Angaben findet unter den gewählten Bedingungen eine tiefer greifende Zersetzung des Weinsäuremoleküls nicht statt, wohl aber beobachtet man in der Schmelze Bläschen aufsteigen, aus Wasserdampf bestehend. Nach der angegebenen Zeit läßt man erkalten, wobei die Schmelze zu einer fast farblosen, glasigen Masse erstarrt. Die erkaltete Schmelze gibt weder für sich noch ihre wässerige Lösung, mit Äther extrahiert, auch nur eine Spur optisch aktiver Substanz an den Äther ab. Bei allen Versuchen erwiesen sich die Ätherextrakte völlig inaktiv, ein Beweis dafür, daß sich aus der Weinsäure unter den angewandten Bedingungen keinerlei in Äther lösliche, optisch aktive Umwandlungsprodukte bilden.

2. Schmelze der Storax-α-zimtsäure.

Eine 30 Minuten auf 168 bis 170° erhitzte Schmelze von Storax-α-zimtsäure löst sich nach dem Abkühlen in Äther. Die ätherische Lösung ist inaktiv und liefert beim Verdunsten einheitliche Storax-α-zimtsäure.

3. Schmelze von inaktiver Zimtsäure und d-Weinsäure.

Das zu den Versuchen verwendete Mengenverhältnis von Zimtsäure und Weinsäure beträgt 1 : 1, entsprechend den Molekulargewichten 148 bzw. 150.

Die bei den einzelnen Schmelzen angewandten absoluten Mengen schwankten von 2 bis 200 g Zimtsäure auf 2 bis 200 g Weinsäure. Je nach den Mengen wechselten auch die verwendeten Schmelzgefäße. Für kleinere Mengen wurden Reagensröhren, für größere Mengen Bechergläser verwendet. Die Schmelze wird, um Überhitzung und damit Zersetzung zu vermeiden, in einem Bad bei einer Temperatur von 168 bis 170° ausgeführt. Die Schmelze ist gleichfalls durch Thermometer zu kontrollieren.

Die Schmelzen von Weinsäure und Zimtsäure mischen sich nicht, sondern bilden zwei scharf getrennte Schichten. Die der Weinsäure hat ein relativ kleines Volumen und befindet sich der größeren Dichte entsprechend zu unterst, während die ihrem Volumen nach viel größere Zimtsäureschmelze die obere Schicht bildet.

Der Eintritt einer Reaktion zwischen den beiden Schichten ist weder zu beobachten, wenn man die Schmelze sich selbst überläßt, noch auch, wenn man die beiden Schichten durch Rühren durcheinanderbringt. Nur in der Weinsäureschmelze ist eine Gasentwicklung zu bemerken, die nach den Erfahrungen bei der für sich geschmolzenen Weinsäure auf Wasserabspaltung zurückzuführen ist.

Steigt die Schmelztemperatur nicht über 170°, so bleibt die Schmelze auch nach langer Schmelzdauer fast farblos.

Die Schmelzdauer variierte bei den einzelnen Versuchen von einer halben bis zu zwei Stunden, ferner wurde in einzelnen Fällen die Schmelze sich selbst überlassen, während in allen anderen Fällen gerührt wurde.

Nach Beendigung der Schmelze wurde stets rasch abgekühlt, bei größeren Quantitäten gießt man zweckmäßig die Schmelze in eine Porzellanschale und kühlt diese mit kaltem Wasser.

Bei richtig geleiteten Operationen muß die nach dem Erkalten feste Schmelze hellelfenbeinfarbig sein.

Verarbeitung der Schmelze.

Zur Trennung der in Wasser löslichen, in Äther dagegen unlöslichen Weinsäureschmelze von dem in Äther löslichen Anteil der Schmelze behandelt man diese mit Wasser und Äther und schüttelt so lange, bis die Gesamtmasse der Schmelze teils in Wasser teils in Äther gelöst ist.

Die abgetrennte wässerige Schicht dreht naturgemäß stark nach rechts und kann unschwer wieder auf Weinsäure verarbeitet werden.

Die ätherische Lösung dagegen dreht bei allen Versuchen, gleichviel ob kürzere oder längere Zeit oder ob mit oder ohne Rühren geschmolzen wurde, sehr stark nach links. Es wurden Drehwerte bis $\alpha = -3{,}48^0$ abgelesen.

Je länger die Schmelzdauer war, um so stärker dreht die ätherische Lösung nach links.

Bei nochmaligem Durchschütteln der ätherischen Lösung mit Wasser drehte die filtrierte wässerige Lösung deutlich nach links. Bei einem Versuche wurde $\alpha = -0{,}14^0$ festgestellt.

Daraus ergibt sich, daß die durch die Weinsäure-Zimtsäureschmelze gebildete, in ätherischer Lösung stark linksdrehende Substanz auch in wässeriger Lösung links dreht.

4. Verdunstungsrückstand der ätherischen Lösung.

Beim freiwilligen Verdunsten der stark linksdrehenden ätherischen Lösungen in einer Krystallisierschale erhält man eine einheitlich aussehende Krystallisation von Storaxzimtsäure in ihrer so außerordentlich charakteristischen β-Form.

Aus einer ätherischen Lösung, die aus einer halbstündigen Schmelze von 10 g Zimtsäure und 10 g Weinsäure erhalten worden war, schied sich ein Teil der gelösten Substanz an der Gefäßwand als dicker, weniger gut krystallisierter Ring ab, während die Bodenkrystalle einheitliche β-Zimtsäure vorstellten. Ein Teil des Ringes, auf Ton abgepreßt und aus ätherischer Lösung durch Verdunsten krystallisiert, gab gleichfalls typische Storax-β-zimtsäure. Mit dem Auge ließ sich die Anwesenheit einer andersartigen Substanz nicht wahrnehmen. Da aber die an der Gefäßwand ausgeschiedene Substanz bei 127° schmilzt und bei der Polarisation lieferte:

1,1 g in Äther gelöst, Vol. 15 ccm, im 20-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -0{,}68°$

$$[\alpha]_D = -4{,}5°$$

während die bis 130° schmelzenden Bodenkrystalle 0,35 g in Äther gelöst, Volumen 15 ccm, im 20-dcm-Rohr nur eine Drehung von $\alpha = -0{,}05$ entsprechend $[\alpha]_D = -0{,}8°$ zeigte, so ergibt sich daraus, daß der Verdunstungsrückstand nicht aus einer einheitlichen höchstdrehenden Substanz besteht, sondern noch ein Gemisch vorstellt von aktiver und inaktiver Substanz verschiedener Löslichkeit.

Zur rascheren Verdunstung der ätherischen Lösung kann man sich mit Vorteil zum Abblasen des Äthers des Gebläses bedienen.

Bemerkenswert ist, daß die Verdunstungsrückstände, besonders solange sie noch nicht trocken sind, sich klebrig anfühlen.

Der bei richtig geleiteten Operationen erhaltene elfenbeinfarbige Verdunstungsrückstand ist seiner ganzen Menge nach saurer Natur, da er sich in verdünnter Sodalösung unter Kohlensäureentwicklung ohne Rückstand löst.

In Alkohol und Äther ist die Substanz leicht löslich und scheidet sich beim Verdunsten des Lösungsmittels wieder in der charakteristischen β-Form ab.

Während also die Zimtsäure, für sich allein geschmolzen, eine Schmelze liefert, deren ätherische Lösung inaktiv ist und aus der sich beim Verdunsten gewöhnliche Storax-α-zimtsäurekrystalle abscheiden, erhält man bei dem Ausziehen der Weinsäure-Zimtsäureschmelze mit Äther und Wasser eine stark nach links drehende ätherische Lösung, aus der sich beim Verdunsten Zimtsäure in ihrer charakteristischen β-Form abscheidet.

Abnahme der Aktivität des Verdunstungsrückstandes durch Reagenzien.

Sehr bemerkenswert ist es, daß sich die β-Form der Zimtsäure des Verdunstungsrückstandes in den verschiedenen Lösungsmitteln sehr hartnäckig erhält. Ebenso zeigte es sich, daß die Aktivität des Verdunstungsrückstandes gegenüber den Reagenzien viel beständiger ist, als man es bei aktiver Zimtsäure erwarten sollte.

So ging eine Probe des trockenen Verdunstungsrückstandes, der in Äther $[\alpha]_D = -4{,}5^0$ drehte, nach zweimaligem Lösen in kochendem Wasser und darauffolgender Lösung in Äther nur auf $\alpha_D = -1{,}9^0$ zurück.

Eine andere Probe, in Äther gelöst, gab beim Schütteln mit verdünnter Sodalösung alle Aktivität an die Sodalösung ab, während die ätherische Lösung inaktiv wurde.

Die im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}60^0$ drehende Sodalösung wurde 10 Minuten gekocht und gab nach Auffüllung auf das frühere Volumen im 2-dcm-Rohr noch eine Drehung von $\alpha = -0{,}27^0$.

Erhitzt man dagegen eine Probe des Verdunstungsrückstandes mit Natronlauge, so fällt auf Zusatz von Salzsäure eine Zimtsäure, die in ätherischer Lösung inaktiv ist und die beim Verdunsten in der bekannten holoedrischen Form der Storax-α-Zimtsäure krystallisiert.

Eine andere Probe wurde endlich 10 Minuten mit 10% Salzsäure gekocht. Die Aktivität ging dabei von $[\alpha]_D = -5{,}60^0$ nur auf $[\alpha]_D = -3{,}20^0$ zurück.

5. Weitere Untersuchung des Verdunstungsrückstandes.

Um festzustellen, ob der besonders bei nicht zu lange fortgeführtem Schmelzen erhaltene, anscheinend einheitliche Rückstand außer linksdrehender Zimtsäure etwa noch andere weinsäurehaltige, gleichsfalls linksdrehende Verbindungen enthält, wurde er mit Ligroin so lange extrahiert, bis nichts mehr in Lösung ging.

Wie zu erwarten war, löste sich der größte Teil des Rückstandes in Ligroin und schied sich beim Erkalten in Form völlig einheitlicher β-Zimtsäure wieder ab, auf deren Aktivität und nähere Beschreibung weiter unten eingegangen wird.

Der nach der Extraktion mit Ligroin verbleibende Rückstand war bei den einzelnen Versuchen in Gewicht und Eigenschaften verschieden.

Das Gewicht wechselte je nach der kürzeren oder längeren Erhitzungsdauer der Schmelze von ca. 10 bis 30% des Ätherverdunstungsrückstandes.

Aus einer Schmelze, bei der ausnahmsweise 80 g Weinsäure und 50 g Zimtsäure eine Stunde lang unter fortwährendem Rühren auf 168 bis 170° erhitzt worden war, wurden 5,5 g in Ligroin unlösliche Substanz in Form eines zerreiblichen Pulvers erhalten, das sich bei 188° zersetzte und ohne weitere Reinigung die folgenden Analysenzahlen lieferte:

0,1188 g Substanz gaben 0,2481 CO_2 und 0,0488 H_2O.

	Ber. für Weinsäure-monocinnamat $C_{13}H_{12}O_7$	Ber. für Dicinnamat $C_{22}H_{18}O_6$	Gef.
C	55,71	64,39	56,95
H	4,64	4,39	4,88

Der gefundene Analysenwert entspricht einem Gemisch von 15% Dicinnamat und 85% Monocinnamat der Weinsäure.

1 g dieser Substanz, in Aceton gelöst — Vol. 17,5 ccm —, drehte im 2-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -3{,}16°$, entsprechend $[\alpha]_D = -27{,}7°$.

Bei den meisten Versuchen, bei denen gleiche Gewichtsmengen Weinsäure und Zimtsäure 1 Stunde und länger geschmolzen wurde, stieg die Menge der in Ligroin unlöslichen Substanz. Sie stellt eine teilweise krystallinische, der Hauptmenge nach gummiartige, sehr klebrige Substanz vor, die erst bei längerem Trocknen bei 75° und darauffolgendem Erkalten fest und zerreiblich wird.

Als höchster Drehwert wurde bisher bei einem durch Extraktion mit Ligroin erhaltenen Rückstand beobachtet:

1,91 g, in 50 ccm Äther gelöst, $c = 3{,}82$, drehten im 1-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -1{,}63°$, $[\alpha]_D = -42{,}7°$.

Alle diese Rückstände sind leicht löslich in Äther, Alkohol, Aceton und Eisessig, dagegen unlöslich bzw. nur teilweise löslich in Benzol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff.

Ferner sind sie bis auf eine geringe Trübung, die durch Filtration durch ein feuchtes, gehärtetes Filter oder auch durch Äther beseitigt werden kann, unter Kohlensäureentbindung in Soda löslich und somit saurer Natur.

Auf Zusatz von Kaliumpermanganatlösung zu der in Soda gelösten Substanz tritt Bittermandelölgeruch auf, wonach sie Zimtsäure in gebundener Form enthält.

Nach der weiteren Untersuchung stellen diese in Ligroin unlöslichen Rückstände Gemische von Mono- und Dicinnamoylweinsäure vor, deren Trennbarkeit unter B behandelt wird. Man hat anzunehmen, daß sich diese Gemische zum Teil von der relativ isomeren, bei der Schmelze entstehenden Metaweinsäure ableiten.

A. Verhalten des Cinnamatgemisches gegen Ätzalkalien.

Der in Ligroin unlösliche Teil der Weinsäure-Zimtsäureschmelze läßt sich, der Auffassung entsprechend, daß er ein Gemisch von Mono- und Dicinnamat der Weinsäure vorstellt, durch Natronlauge sehr leicht verseifen.

Zu diesem Zweck braucht man die Substanz nur kurze Zeit mit einem kleinen Überschuß von Natronlauge zu erwärmen. Nach dem Erkalten fällt auf Zusatz von Salzsäure ein weißer Niederschlag aus, der sich vollständig in Äther löst. Die ätherische Lösung ist optisch inaktiv und hinterläßt beim Verdunsten die abgespaltene Zimtsäure in ihrer vollflächigen α-Form.

In zwei Präparaten des Cinnamatgemisches wurde durch Verseifung der Gehalt an gebundener Zimtsäure bestimmt.

1 g des Cinnamatgemisches, dessen Analyse oben mitgeteilt wurde, lieferte 0,55 g Zimtsäure, also in Übereinstimmung mit der Analyse etwas mehr, als sich für Monocinnamat berechnet: 0,52 g.

1,89 g eines an Dicinnamat reicheren Gemisches lieferte 1,02 g Zimtsäure, für Dicinnamat berechnet 1,3 g.

Die nach der Verseifung mit Salzsäure angesäuerte und mit Äther extrahierte Lösung enthält außer Weinsäure keine andere organische Substanz mehr.

Zum Nachweis der Weinsäure wird die salzsaure Lösung eingedampft. Der Rückstand, der neben Kochsalz die Weinsäure enthält, wird mit Alkohol ausgezogen, bis das Kochsalz frei von organischer Substanz ist. Der alkoholische Auszug hinterläßt beim Eindampfen die Weinsäure zum Teil in ihrer Metaform, die erst allmählich krystallinisch wird, und läßt sich nicht nur durch den Caramelgeruch beim Erhitzen, sondern auch durch Überführung in Weinstein und durch die Rechtsdrehung ihrer Lösung identifizieren.

Die Verseifung der Cinnamatgemische durch Natronhydrat findet bereits in der Kälte statt und läßt sich, wie die folgenden Versuche zeigen, mit Hilfe des Polarisationsapparates verfolgen.

1 g Cinnamatgemisch, in Soda kalt gelöst — Vol. 15 ccm —, drehte im 1-dcm-Rohr $\alpha = -1{,}50^0$. Die eine Hälfte der Lösung wurde mit 5 ccm Natronlauge versetzt und im 1-dcm-Rohr die Drehung beobachtet.

Nach 5 Minuten . . . . . $\alpha = -0{,}16^0$,
„ 10 „ . . . . . $\alpha = -0{,}08^0$.
Dann wurde abgelesen . . . . $\alpha = 0{,}00^0$,
$\alpha = +0{,}15^0$,
$\alpha = +0{,}50^0$,
$\alpha = +0{,}75^0$.

Die andere Hälfte der Lösung wurde 5 Minuten nach Zusatz von 5 ccm Natronlauge gekocht, schnell abgekühlt und polarisiert:

$$\alpha = +0{,}70^0.$$

Von dem $[\alpha]_D = -42{,}7^0$ drehenden Cinnamatgemisch wurden 1,89 g in Soda in der Kälte gelöst und die Lösung auf 70 ccm gebracht und polarisiert:

$$\alpha = -2{,}58^0.$$

Nun wurde mit verdünnter Natronlauge auf 80 ccm aufgefüllt, durchgeschüttelt und im 2-dcm-Rohr polarisiert.

Die erst noch vorhandene Linksdrehung geht alsbald auf 0,00 herab, sodann tritt Rechtsdrehung auf, bis nach dem Stehen über Nacht der Höchstwert von $\alpha = +0{,}60^0$ erreicht wurde. Rechnet man $c = 2{,}7$, so entspricht dieser Winkel einem $[\alpha]_D = +12{,}71^0$.

Wie Natronhydrat wirkt auch Ammoniak schon in der Kälte verseifend auf das Cinnamatgemisch ein.

3 g desselben wurden in Ammoniak gelöst, die Lösung auf 100 ccm aufgefüllt, entsprechend $c = 3$, und im 1-dcm-Rohr polarisiert:

Anfangsdrehung	$\alpha = -0{,}75°$.
Nach 24 Stunden . . .	$\alpha = -0{,}50°$,
„ 48 „ . . .	$\alpha = -0{,}25°$,
„ 72 „ . . .	$\alpha = -0{,}13°$,
„ 120 „ . . .	$\alpha = -0{,}00°$.

In der Kälte verläuft also die Verseifung durch das Ammoniak nur sehr langsam, dagegen rasch in der Hitze.

Von einem Präparat, das $[\alpha]_D = -16{,}5°$ drehte, wurden 0,2 g mit Ammoniakflüssigkeit eine halbe Stunde erwärmt. Nach dem Abkühlen drehte die Lösung $\alpha = +0{,}41°$.

Aus der ammoniakalischen Lösung fällt auf Zusatz von Salzsäure Zimtsäure, deren ätherische Lösung inaktiv ist.

B. Verhalten der Cinnamatgemische in verdünnter Sodalösung.

Von größter Wichtigkeit ist das Verhalten der in Ligroin unlöslichen Cinnamatgemische in kalter verdünnter Sodalösung. Während, wie im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, die Lösung der Cinnamatgemische in kalter verdünnter Natronlauge sehr rasch von Linksdrehung durch den Nullpunkt in Rechtsdrehung übergeht und die Lösung in Ammoniak dieselbe Erscheinung zeigt, nur sehr viel langsamer, zeigen die folgenden Versuche, daß die Lösungen der Cinnamatgemische in kalter verdünnter Sodalösung, wenn sie keinen beträchtlichen Überschuß an Soda enthalten, gerade umgekehrt, wie die Lösungen in Natron oder Ammoniak, direkt nach ihrer Herstellung eine bedeutend geringere Linksdrehung, als nach mehrtägigem Stehen in der Kälte aufweisen.

Versuch 1.

9 g Cinnamatgemisch wurden in kalter Soda gelöst, durch Filtration durch ein nasses Filter geklärt, sodann auf 215 ccm aufgefüllt und polarisiert:

$c = 4{,}2$, 2-dcm-Rohr; $\alpha = -2{,}09°$, entsprechend $[\alpha]_D = -24{,}9°$.

Nach dem Stehen über Nacht	$\alpha = -2{,}28°$.	
Nach 48 Stunden . .	$\alpha = -2{,}35°$,	
„ 72 „ . .	$\alpha = -2{,}35°$,	
„ 96 „ . .	$\alpha = -2{,}35°$,	entsprechend $[\alpha]_D = -28°$.

Versuch 2.

17 g Cinnamatgemisch, in wenig mehr als der berechneten Menge Soda gelöst — Vol. 140 ccm —, drehten kurz nach der Herstellung im 2-dcm-Rohr:

Im Mittel . . . . . $\alpha = -6{,}23°$, d. i. $[\alpha]_D = -25{,}7°$.
Nach 20 Stunden . . . $\alpha = -6{,}41°$,
„ 2 Tagen . . . . $\alpha = -6{,}57°$,
„ 3 „ . . . . $\alpha = -6{,}64°$,
„ 5 „ . . . . $\alpha = -6{,}66°$,
„ 7 „ . . . . $\alpha = -6{,}71°$,
„ 8 „ . . . . $\alpha = -6{,}75°$,
„ 9 „ . . . . $\alpha = -6{,}80°$, d. i. $[\alpha]_D = -28{,}1°$,
„ 10 „ . . . . $\alpha = -6{,}84°$,
„ 11 „ . . . . $\alpha = -6{,}86°$,
„ 13 „ . . . . $\alpha = -6{,}87°$,
„ 14 „ . . . . $\alpha = -6{,}89°$,
„ 18 „ . . . . $\alpha = -6{,}90°$, d. i. $[\alpha[_D = -28{,}4°$.

Statt einer Abnahme des Drehungsvermögens ließ sich hier also eine Zunahme im $[\alpha]_D$ um fast 3 ganze Grade feststellen.

Versuch 3.

4,1 g Dicinnamat, das nach einer unten beschriebenen neuen Methode gewonnen war, wurde in Sodalösung, die 3,72 g Na_2CO_3 enthielt, 7 Atomen Natrium entsprechend, aufgelöst — Vol. 42,5 ccm — und im 2-dcm-Rohr polarisiert:

Direkt nach der Herstellung
$\alpha = -12{,}77°$, d. i. $[\alpha]_D = -66{,}0°$.
Nach 20 Stunden $\alpha = -13{,}23°$,
„ 2 Tagen $\alpha = -13{,}99°$,
„ 3 „ $\alpha = -14{,}46°$,
„ 4 „ $\alpha = -14{,}80°$, d. i. $[\alpha]_D = 76{,}7°$.

Bei diesem Versuch konnte also eine Zunahme um mehr als $10°$ im $[\alpha]_D$ festgestellt werden.

Versuch 4.

Ein anderes Resultat aber wurde erhalten bei Zusatz eines sehr großen Überschusses an Sodalösung.

1,025 g Dicinnamat in einer 3,41 g Na_2CO_3 enthaltenden Lösung, entsprechend 25,7 Atomen Natrium — Vol. 42,5 ccm —, drehten im 2-dcm-Rohr kurz nach der Herstellung:

$\alpha = -3{,}45°$, d. i. $[\alpha]_D = 71{,}6°$.
Nach 20 Stunden $\alpha = -3{,}88°$, d. i. $[\alpha]_D = 80{,}5°$,
„ 2 Tagen $\alpha = -3{,}76°$,
„ 3 „ $\alpha = -3{,}60°$,
„ 4 „ $\alpha = -3{,}41°$.

Bei Anwendung eines großen Überschusses von Soda findet also zuerst noch eine Steigerung des Drehungsvermögens um etwa 9° statt und sodann nach mehreren Tagen eine Abnahme bis zum Anfangswert.

Bei einer Reihe weiterer Versuche konnte bei Anwendung eines großen Überschusses an Soda gleichfalls direkt eine Abnahme des Drehungswertes festgestellt werden.

Ein in einem großen Überschuß von Soda gelöstes Monocinnamat ging in seinem Drehungsvermögen von $\alpha = -0{,}21$ nach 14 Tagen auf 0 herunter und zeigte nach 20 Tagen schwache Rechtsdrehung.

Versuch 5.

Wie der folgende Versuch zeigt, gelingt es leicht, durch Kochen der Sodalösung die Linksdrehung zu zerstören und die Rechtsdrehung der freigemachten δ-Weinsäure zum Vorschein zu bringen.

0,5 g eines Cinnamats von $[\alpha]_D = -16{,}5°$ wurde in Sodalösung bis zu 3 Stunden erhitzt.

Nach 1 Stunde Vol. 52 ccm $\alpha = +0{,}30°$,
„ 3 Stunden „ 52 „ $\alpha = +0{,}35°$.

Dieses durchaus verschiedene Verhalten des Cinnamatgemisches gegen kohlensaure bzw. Ätzalkalien in der Kälte war von größter Bedeutung für die weitere Erforschung des in Ligroin unlöslichen Teils der Weinsäure-Zimtsäureschmelze.

Es wurde nämlich gefunden, daß das Cinnamatgemisch beim Stehen in kalter Sodalösung, obwohl die Aktivität nicht verloren geht, nach längerer oder kürzerer Zeit mehr oder weniger weitgehend verseift wird und daß die durch die Verseifung abgespaltene Zimtsäure optisch aktiv, und zwar linksdrehend ist.

Die Verseifung geht zuerst bis zum Monocinnamat, das zusammen mit ursprünglich vorhandenem Monocinnamat, seiner größeren Löslichkeit in Wasser entsprechend, nach dem Ansäuern zugleich mit etwas freier Zimtsäure in Lösung bleibt, während die Hauptmenge der abgespaltenen Zimtsäure mit dem unveränderten Teile des Dicinnamats als flockiger Niederschlag ausfällt.

Nach dem Abfiltrieren des Niederschlags läßt sich aus dem Filtrat einheitliches Monocinnamat gewinnen.

Mono- und Dicinnamat der δ-Weinsäure.

Die aus einer Reihe von Versuchen stammenden Sodalösungen eines Cinnamatgemisches wurden nach dem Ansäuern und nach dem Abfiltrieren von Dicinnamat und Zimtsäure mit Äther ausgezogen. Aus der ätherischen Lösung schied sich, nachdem ein Teil des Äthers bei gewöhnlicher Temperatur verdunstet war, in größerer Menge ein rein weißes, krystallinisches, nicht klebriges Produkt ab, das abgesaugt und getrocknet wurde. Sein Zersetzungspunkt wurde bei 188° gefunden. Im trockenen Reagensrohr erhitzt, zersetzt es sich unter Hinterlassung eines braunen, kohligen Rückstandes, gleichzeitig tritt neben dem Geruch nach Zimtsäure deutlich Caramelgeruch auf. Es löst sich leicht in heißem Wasser, ohne beim Erkalten wieder ausgeschieden zu werden. Desgleichen in Sodalösung, aus der es sich auf Zusatz von Salzsäure nur bei großer Konzentration teilweise wieder abscheidet, während es bei stärkerer Verdünnung in Lösung bleibt.

Die getrocknete Substanz löst sich in kaltem Äther nur schwer und fällt aus dieser Lösung auf Zusatz von Ligroin in Form sehr feiner weißer Kryställchen aus.

0,1142 gaben 0,2345 CO_2 und 0,0428 H_2O.

	Ber. f. $C_{13}H_{12}O_7$	Gef.
C	55,71	56,00
H	4,64	4,19

0,5 g dieser Substanz in Soda gelöst und auf 20 ccm aufgefüllt, entsprechend $c = 2{,}5$, drehten im 2-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -0{,}91°$

$$[\alpha]_D = -18{,}2°.$$

Bei der Berechnung des $[\alpha]_D$ wurde außer acht gelassen, daß die Säure in Lösung als Natriumsalz vorhanden ist.

Aus einem anderen Präparat des Cinnamatgemisches wurde in der gleichen Weise aus der mit Salzsäure angesäuerten Lösung nach dem Abfiltrieren des Niederschlags das gebildete Monocinnamat ausgeäthert und aus der eingeengten ätherischen Lösung mit Ligroin zur Ausscheidung gebracht. Das weiße krystallinische Pulver zersetzte sich gleichfalls bei 188°.

Nach dem Trocknen bei 105° ergab die Analyse:

0,1518 gaben 0,3119 CO_2 und 0,0618 H_2O.

	Ber. f. $C_{13}H_{12}O_7$	Gef.
C	55,71	55,97
H	4,64	4,52

0,3 g in 20 ccm Sodalösung $c = 1{,}5$, drehten im 2-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -0{,}50°$, d. i. $[\alpha]_D = -16{,}6°$.

Bei einem weiteren Versuch wurde in der gleichen Weise aus der Sodalösung nach dem Ansäuern und Filtrieren ein Monocinnamat von den gleichen Eigenschaften erhalten.

0,2 g in 15,5 ccm Sodalösung $c = 1{,}3$, drehten im 2-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -0{,}43°$, d. i. $[\alpha]_D = -16{,}5°$.

Der bei diesem Versuch gleich nach der Lösung in Soda gefällte Niederschlag, der vorzugsweise aus Dicinnamat und etwas Zimtsäure bestehen mußte, wurde nach dem Trocknen bei 75° zur Entfernung der Zimtsäure mit Ligroin ausgekocht, das eine nur geringe Menge Zimtsäure aufnahm und darauf wieder bei 75° getrocknet.

0,2 g in 20 ccm Sodalösung, $c = 1\%$, drehte im 1-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -0{,}54°$, d. i. $[\alpha]_D = -54°$.

0,1257 gaben 0,2806 CO_2 und 0,0512 H_2O.

Ber. f. $C_{22}H_{18}O_6$		Gef.
C	64,39	60,87
H	4,39	4,52

Ein anderes Cinnamatgemisch wurde in der nämlichen Weise kalt in Soda gelöst, sofort zur Klärung filtriert und mit Salzsäure das Dicinnamat ausgefällt und abfiltriert. Der Niederschlag wurde nach dem Auswaschen bei 75° getrocknet, nach dem Erkalten gepulvert und zur Entfernung der Zimtsäure mit Ligroin ausgekocht, sodann aufs neue bei 75° getrocknet. Die Substanz war nach dem Erkalten glasig, fest.

0,3 g in 25 ccm Sodalösung $c = 1{,}2$, drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -1{,}67°$ oder $[\alpha]_D = -69{,}6°$.

0,1565 gaben 0,3633 CO_2 und 0,0726 H_2O.

Ber. f. $C_{22}H_{18}O_6$		Gef.
C	64,39	63,31
H	4,39	5,15

Die mitgeteilten Versuche zeigen zur Genüge, daß der in Ligroin unlösliche Anteil der Weinsäure-Zimtsäureschmelze ein in Gewicht und Eigenschaften variables Gemisch von Mono- und Dicinnamat der Weinsäure vorstellt, das sich durch Sodalösung trennen läßt. Während es unschwer gelingt, auf diesem Wege das Monocinnamat in einheitlicher Form zu gewinnen, war es bisher nicht möglich, das Dicinnamat so zu erhalten, daß es bei der Analyse genau stimmende Zahlen lieferte, da, wie

beobachtet wurde, aus dem Dicinnamat nicht nur durch die Sodalösung, sondern auch durch Wasser, ferner beim Trocknen, wie die Sublimation von Zimtsäure zeigt, kleine Mengen Zimtsäure abgespalten werden, wodurch die etwas zu niedrigen Kohlenstoffwerte der bisher analysierten Präparate leichtverständlich werden.

Für die vorliegende Untersuchung haben die bei der Schmelze entstehenden Cinnamatgemische, die bei der Verseifung außer Weinsäure und Zimtsäure keine andere organische Substanz liefern, nur insoweit Interesse, als es gelingt, durch Verseifung mit Soda aus ihnen völlig weinsäurefreie bis über $[\alpha]_D = -20^0$ drehende Zimtsäurepräparate zu gewinnen, wodurch der definitive Beweis geliefert wird, daß die ungesättigte Zimtsäure, abweichend von den bisherigen Vorstellungen, in molekular asymmetrischer Form verbunden mit Drehungsvermögen auftreten kann.

6. Methoden zum Nachweis der Abwesenheit geringster Spuren von Cinnamaten bzw. Weinsäure in Präparaten aktiver Zimtsäure.

Bevor ich auf die Beschreibung der bisher dargestellten bis über $[\alpha]_D = -20^0$ drehenden Zimtsäurepräparate eingehe, ist es notwendig, die Methoden mitzuteilen, mit Hilfe deren es gelingt, in aktiven Zimtsäurepräparaten die Abwesenheit geringster Spuren der Cinnamate mit Sicherheit nachzuweisen.

Qualitativer Nachweis der Abwesenheit von Cinnamaten in den aktiven Zimtsäurepräparaten.

Viel bequemer als die Elementaranalyse sind auch in diesem Falle die qualitativ analytischen Methoden, die es ermöglichen, die minimalsten Mengen von Weinsäure bzw. Cinnamat neben Zimtsäure mit Sicherheit nachzuweisen.

Da die zu beschreibenden Präparate von linksdrehender Zimtsäure ihre Aktivität, wenn sie nicht der Säure selbst eigentümlich wäre, nur allein der Beimengung größerer Mengen von linksdrehenden Cinnamaten verdanken könnten, so sind diese qualitativen Methoden bei ihrer großen Empfindlichkeit zum Nachweis etwa vorhandener Cinnamate außerordentlich empfehlenswert.

1. Methode.

Da der in Äther lösliche, linksdrehende Anteil der Weinsäure-Zimtsäureschmelze außer Zimtsäure und dem, durch Verseifung mit Natronhydrat lediglich in Weinsäure und inaktive Zimtsäure zerfallenden Cinnamatgemisch, keine andere organische Substanz enthält, so kann man durch Behandlung der auf Cinnamat zu untersuchenden aktiven Zimtsäurepräparate mit Natronhydrat mit Sicherheit die Anwesenheit von Cinnamat ausschließen.

Bei Anwesenheit von Weinsäure in Form von Spuren Cinnamat läßt sich, wie gezeigt, auf Zusatz von Natronlauge bereits in der Kälte der Rückgang der Linksdrehung auf Null und sodann der Übergang in eine mehr oder weniger starke Rechtsdrehung, von der in Freiheit gesetzten d-Weinsäure bzw. ihren etwas stärker drehenden Natriumsalz herrührend, mit größter Schärfe beobachten.

Bei Abwesenheit von Cinnamatgemisch dagegen geht die mit Natronlauge behandelte aktive Zimtsäure lediglich auf Null zurück.

Zur Ergänzung dieser Prüfung säuert man die inaktive alkalische Lösung mit Salzsäure an, erschöpft die Lösung zur Entfernung der inaktiv gewordenen Zimtsäure mit Äther und dampft die salzsaure Lösung zur Trockne ein. Bei Abwesenheit von Weinsäure erhält man reines Kochsalz, das frei von jeglicher organischen Substanz ist.

2. Methode.

Viel einfacher und leichter ausführbar ist die folgende Methode, die es gleichfalls gestattet, sehr kleine Mengen von Weinsäure bzw. Cinnamaten neben Zimtsäure nachzuweisen.

Sie beruht darauf, daß die Weinsäure und die Cinnamate beim Erhitzen nicht unverändert flüchtig sind, sondern sich unter starker Verkohlung zersetzen, während die Zimtsäure unter geeigneten Bedingungen sich beim Erhitzen vollständig und ohne Zersetzung verflüchtigen läßt.

Bringt man nicht mehr als eine Federmesserspitze, ungefähr 0,01 g, reiner Zimtsäure in ein trocknes Reagensrohr und läßt dieses von der Stelle, an der die Substanz liegt, bis ca. 6 cm weiter bei vollständig wagerechter Haltung des Reagens-

rohrs wiederholt durch die Flamme gehen, so sieht man, wie zuerst die Zimtsäure ohne Gasentwicklung zu einem klaren Tropfen zusammenschmilzt, um dann, ohne eine Spur Rückstand zu hinterlassen, in den kälteren Teil des Reagensrohres zu sublimieren, wo sie sich als ein farbloser krystallinischer Beschlag absetzt.

Nimmt man zu viel Zimtsäure, hält das Reagensrohr schief, so daß geschmolzene Zimtsäure zurückfließen kann, und erhitzt so hoch, daß die Zimtsäure an Ort und Stelle zum Sieden kommt, so zersetzt sich die Zimtsäure unter Gelbfärbung und kann gleichfalls einen kohligen Rückstand hinterlassen.

Zum Unterschied von der Zimtsäure lassen sich dagegen weder Weinsäure noch die beiden Cinnamate oder deren Gemische unter den Bedingungen, unter denen, wie erwähnt, reine Zimtsäure sich von einer Stelle des Reagensrohrs zu der anderen ohne Zersetzung sublimieren läßt, verflüchtigen. Die Anwesenheit von Weinsäure und Cinnamaten macht sich bereits beim Schmelzen bemerkbar durch die Gasentwicklung und darauffolgende Braunfärbung und Verkohlung. An der Stelle, wo die Substanz geschmolzen wurde, hinterblieb ein braunschwarzer Fleck oder Ring.

Durch die Bildung eines solchen Fleckes lassen sich in einem Gemisch von Zimtsäure und Cinnamat bzw. Weinsäure sehr kleine Mengen dieser Substanzen nachweisen.

Zu 0,01 g Zimtsäure wurde in einem Reagensrohr 0,1 ccm einer Lösung von 0,1 g Weinsäure in 1000 ccm Wasser gegeben und in der geschilderten Weise zuerst das Wasser verjagt und dann die Zimtsäure wegsublimiert, wobei mehrere kleinere, deutlich wahrnehmbare braune Flecken hinterblieben.

Nach diesem Resultat kann man also annehmen, daß eine stark aktive Zimtsäure, wenn sie auf diese Weise erhitzt ohne Hinterlassung auch nur des kleinsten braunen Fleckens oder braunumränderten Kreises sublimiert, keine nennenswerte Menge von Cinnamat mehr enthält, daß vielmehr die beobachtete Aktivität durch das Zimtsäuremolekül selbst verursacht wird.

Alle bisher gewonnenen, in der Folge zu beschreibenden aktiven Zimtsäurepräparate wurden zuerst nach diesen beiden Methoden auf einen etwaigen Gehalt an Cinnamat geprüft und nur die, bei denen die Prüfung die Abwesenheit von Cinnamat erkennen ließ, analysiert.

Im 7. Abschnitt werden die durch direkte Krystallisation des Ätherverdunstungsrückstandes aus 20%igem Alkohol erhaltenen aktiven Zimtsäurepräparate, im 8. Abschnitt die aus dem gleichen Produkt mit Ligroin extrahierten aktiven Zimtsäuren und im 9. Abschnitt die durch Verseifung mit kalter Sodalösung und heißem Wasser extrahierten, stark linksdrehenden Präparate beschrieben.

7. Gewinnung linksdrehender Zimtsäurepräparate durch Krystallisation des Ätherverdunstungsrückstandes aus 20%igen Alkohol.

Die ersten linksdrehenden Zimtsäurepräparate, die genau stimmende Analysenzahlen lieferten, wurden direkt aus dem Verdunstungsrückstand, der beim Schütteln der Weinsäure-Zimtsäureschmelze mit Wasser und Äther erhaltenen ätherischen Lösung durch Krystallisation aus 20%igem Alkohol hergestellt.

1. Präparat.

Ein Gemisch von 10 g Weinsäure und 10 g Zimtsäure wurde $^3/_4$ Stunden unter Umrühren bis auf 170° erhitzt. Nach raschem Abkühlen wurde die zerkleinerte Schmelze mit Wasser und Äther geschüttelt. Die ätherische Schicht — Vol. 78 ccm — drehte im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}51°$.

Von 55 ccm der ätherischen Lösung wurde der Äther ungefähr bis zur Hälfte abgeblasen und die abgeschiedene Zimtsäure abgesaugt. Nach dem Trocknen auf Ton wog die Substanz 3,4 g und schmolz bei 130 bis 131°. 1 g in Äther gelöst — Vol. 20 ccm — drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}09$ entsprechend $[\alpha]_D = -0{,}9°$.

Das ätherische Filtrat wurde mit dem Gebläse zur Trockne gebracht und hinterließ 3,2 g Säure, die aus 20%igem Alkohol umkrystallisiert wurden. Die ausgeschiedene Zimtsäure wog trocken 2,4 g und schmolz bei 131 bis 132°.

Eine Lösung von 1,2 g in Äther — Vol. 20 ccm — drehte im 2-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -0{,}30°$, d. i. $[\alpha]_D = -2{,}4°$.

0,1426 g gaben 0,3821 CO_2 und 0,0731 H_2O.

Ber. für $C_9H_8O_2$		Gef.
C	72,97	73,08
H	5,41	5,69

2. Präparat.

Der bei einer anderen Schmelze erhaltene Ätherverdunstungsrückstand wurde aus möglichst wenig 20%igem Alkohol in der Wärme umkrystallisiert. Die beim raschen Erkalten abgeschiedene Substanz wurde abgesaugt und getrocknet. Sie schmolz bei 130 bis 133°.

1,1 g in 20 ccm Äther gelöst, $c = 5{,}5$, drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}50°$, d. i. $[\alpha]_D = -4{,}54°$.

1. 0,1745 g gaben 0,4666 CO_2 und 0,0886 H_2O.
2. 0,1711 g „ 0,4575 „ „ 0,0854 „

Ber. für $C_9H_8O_2$		Gef. 1.	2.
C	72,97	72,92	72,92
D	5,41	5,64	5,58

Die Zimtsäure hinterließ bei der Sublimation im Reagensrohr keinen braunen Fleck.

3. und 4. Präparat.

Beim Abblasen einer aus einer $^3/_4$ Stunden unter Umrühren fortgeführten Schmelze von 20 g Zimtsäure und 20 g Weinsäure erhaltenen ätherischen Lösung wurden 12 g Rohprodukt in noch feuchtem Zustand erhalten, das abgesaugt und auf Ton getrocknet wurde.

6 g davon wurden aus 200 ccm 20%igem Alkohol umkrystallisiert, abgesaugt, ausgewaschen und getrocknet. Weinsäureprobe negativ.

1,4 g in 20 ccm Äther gelöst, $c = 7$, drehten im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}23°$, d. i. $[\alpha]_D = -3{,}2°$.

0,1160 g gaben 0,3100 CO_2 und 0,0556 H_2O.

Ber. für $C_9H_8O_2$		Gef.
C	72,97	72,88
H	5,41	5,36

Aus dem ätherischen Filtrat wurde beim Eindampfen ein Krystallbrei gewonnen, der, auf Ton abgepreßt, etwas gelblich gefärbt war. Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz in Soda gelöst, die Lösung mit Äther ausgezogen und darauf gefällt. Der sich ausscheidende, weiße Niederschlag wurde abgesaugt, ausgewaschen und getrocknet. Die trockene Substanz schmolz bei 129 bis 133° und war weinsäurefrei.

1 g in 20 ccm Äther, $c = 5$, drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}50°$, d. i. $[\alpha]_D = -5°$.

0,1298 g gaben 0,3481 CO_2 und 0,0630 H_2O.

Ber. für $C_9H_8O_2$		Gef.
C	72,97	73,06
H	5,41	5,43

Die angeführten Versuche zeigen, daß man direkt aus dem Ätherverdunstungsrückstand der Weinsäure-Zimtsäureschmelze, der, wie vorher bewiesen wurde, lediglich aus ligroinlöslicher Zimtsäure und ligroinunlöslichem Cinnamatgemisch besteht, durch Krystallisation aus 20%igem Alkohol zu wein-

säurefreien, einige Grade drehenden Zimtsäurepräparaten gelangen kann, die bei der Verbrennung bis in die erste Dezimalstelle stimmende Kohlenstoffwerte liefern.

Diese Präparate stellen, wie die verschiedenen Drehwerte zeigen, naturgemäß noch Gemische von viel inaktiver Zimtsäure und relativ wenig aktiver Zimtsäure vor, und es wird verständlich, daß, wenn man zu verdünnt arbeitet, sich auch Zimtsäure von sehr niedrigem Drehwert, ja sogar inaktive Präparate, abscheiden können, da die hochdrehenden Zimtsäurepräparate, ihrem niedrigeren Schmelzpunkt entsprechend, leichter löslich sind und deshalb ganz oder teilweise in der Mutterlauge gelöst bleiben können.

8. Ligroinlöslicher Teil des Ätherverdunstungsrückstandes.

Die Untersuchung der d-Weinsäure-Zimtsäureschmelze hat gelehrt, daß sie, mit Äther und Wasser geschüttelt, in eine rechtsdrehende wässerige Schicht, die die unveränderte Weinsäure, und in eine stark linksdrehende ätherische Schicht, die ein Gemisch von linksdrehenden Mono- und Dicinnamat und freier Zimtsäure enthält, geschieden wird.

Zur Trennung der in der ätherischen Lösung enthaltenen Verbindungen wird der beim Verdunsten dieser Lösung hinterbleibende Rückstand nach dem Trocknen so lange mit Ligroin auf dem Dampfbad ausgekocht, bis nichts mehr in Lösung geht.

Aus den Ligroinlösungen scheidet sich die Zimtsäure rein weiß in ihrer β-Form aus. Die Präparate zeigen den Schmelzpunkt 133°.

Eine große Reihe von Versuchen ergab, daß sowohl das Cinnamatgemisch, als besonders das amorphe Dicinnamat leicht noch geringe Mengen von Zimtsäure zurückhalten, so daß zur Entfernung der letzten Reste von Zimtsäure eine oft wiederholte Extraktion nötig ist, bis zuletzt nichts mehr in Lösung geht.

Um zu zeigen, daß die Cinnamate und insbesondere das Dicinnamat in heißem Ligroin unlöslich sind, wurden die nach der Entfernung der Zimtsäure erhaltenen Rückstände zum Teil im Soxhlet, zum Teil direkt längere Zeit mit Ligroin extrahiert. Die Ligroinextrakte wurden darauf eingedampft und nach der Methode 1 auf Weinsäure geprüft. In keinem Falle ließ sich Weinsäure nachweisen, woraus sich ergibt, daß die Cinnamate in heißem Ligroin unlöslich sind.

Als Beispiel für den Verlauf der Gewinnung der Zimtsäure aus dem Ätherverdunstungsrückstand sei ein Versuch angeführt.

13,4 g des trockenen Ätherverdunstungsrückstandes einer $^3/_4$ Stunden unter Umrühren fortgesetzten Schmelze wurden so lange mit Ligroin ausgekocht, bis 1,91 g gelblich kolloidale Substanz ungelöst zurückblieb.

Von der aus dem Ligroin in der Kälte abgeschiedenen Zimtsäure wurden 1,15 g in 20 ccm Äther gelöst, $c = 5{,}75$, im 2-dcm-Rohr polarisiert: $\alpha = -0{,}18^0$, d. i. $[\alpha]_D = -1{,}6^0$.

2,92 g dieser Säure wurden in Soda und Natronhydrat gelöst und erwärmt, wobei die Lösung inaktiv wurde. Nach dem Ansäuern und Entfernung der Zimtsäure mit Äther wurde die salzsaure Lösung eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung war inaktiv.

Es ergibt sich daraus, daß die Linksaktivität der in Ligroinlösung gegangenen Zimtsäure nicht etwa von in Lösung gegangenem, gleichfalls linksdrehendem Cinnamat herrühren kann.

Die bei den einzelnen Versuchen erhaltenen, aus Ligroin krystallisierten Zimtsäuren variierten in ihrer spezifischen Drehung von ca. $[\alpha]_D = -1^0$ bis $[\alpha]_D = -2^0$.

Von diesen Präparaten ausgehend, wurden noch 3 Versuche angestellt, um die völlige Abwesenheit von Cinnamaten in dem ligroinlöslichen Teile der Schmelze zu beweisen.

Bei einem Versuche wurden 5 g, bei einem zweiten Versuche 6 g der aus Ligroin ausgeschiedenen linksdrehenden Zimtsäure durch Erwärmen mit Natronhydrat inaktiviert. Eine Rechtsdrehung trat nicht auf, ebensowenig ließ sich in der angesäuerten Lösung nach Entfernung der Zimtsäure Weinsäure nachweisen.

Bei dem dritten Versuche wurden 4 g Zimtsäure in Soda gelöst, auf 45 ccm aufgefüllt, $c = 8{,}88$, und im 2-dcm-Rohr polarisiert:

$\alpha = -0{,}52^0$, d. i. $[\alpha]_D = -2{,}9^0$ auf Säure berechnet. Danach scheint die Drehung der aktiven Säure in Sodalösung etwas stärker zu sein als in indifferenten Lösungsmitteln.

Auch diese Lösung wurde beim Erwärmen mit Natronlauge nur inaktiv, aber nicht rechtsdrehend, und war daher frei von Weinsäure verbindungen.

Es bleibt danach keine andere Erklärung möglich, als daß bei der Weinsäure-Zimtsäureschmelze ein wenn auch geringer Teil der nicht mit der Weinsäure in Verbindung tretenden Zimtsäure durch die induzierende Wirkung der Weinsäure aktiviert wird, und zwar in der der Weinsäure entgegengesetzten Richtung. Durch die weiter unten mitgeteilten

Resultate bei den Schmelzen von Weinsäure mit Zimtsäureanhydrid findet diese Auffassung ihre Bestätigung.

Daß die Extraktion des Ätherverdunstungsrückstandes mit wässerigem Alkohol aktive Zimtsäure mit höherem $[\alpha]_D$ gibt, als die Extraktion mit Ligroin, muß, wie der übernächste Abschnitt lehrt, auf eine partielle Verseifung des Cinnamatgemisches durch den stark wasserhaltigen Alkohol zurückgeführt werden.

9. Darstellung über $[\alpha]_D = -20^0$ drehender Zimtsäurepräparate aus den Cinnamatgemischen durch Verseifung mit kalter Sodalösung.

Wie im 5. Abschnitt B gezeigt wurde, gelingt es, mit kalter verdünnter Sodalösung die beiden Cinnamate voneinander zu trennen. Beim Ansäuern der das Cinnamatgemisch enthaltenden Sodalösung mit Salzsäure bleibt das in Wasser reichlich lösliche Monocinnamat in Lösung, aus der es sich nach dem Abfiltrieren des Niederschlages mit Äther ausziehen läßt, während der Niederschlag aus Dicinnamat gemischt mit kleineren oder größeren Mengen abgespaltener Zimtsäure besteht. Je kürzer das Cinnamatgemisch in der kalten Sodalösung verbleibt, um so weniger Zimtsäure enthält der Niederschlag.

Bei einem Versuch war der gleich nach der Lösung wieder ausgefällte Niederschlag nach dem Trocknen mit Ligroin ausgekocht worden. In Ligroinlösung war nur eine ganz geringe Menge Zimtsäure eingegangen, der ausgezogene Rückstand bestand, wie die Analyse erkennen ließ, aus Dicinnamat. Zur Gewinnung von stark linksdrehenden Zimtsäurepräparaten wurde daher die klar filtrierte Sodalösung des Cinnamatgemisches zwei bis drei Tage in der Kälte stehen gelassen, sodann mit Salzsäure ausgefällt. Der abgeschiedene Niederschlag auf einem glatten Filter gesammelt und ausgewaschen, sodann in ein Becherglas gespült und mit heißem Wasser auf dem Dampfbad so lange digeriert, bis nichts mehr in Lösung ging, endlich heiß filtriert und das Filtrat rasch abgekühlt. Dabei tritt zuerst eine ölige Trübung ein und dann scheidet sich ein mikrokrystallinischer Niederschlag ab, der filtriert, ausgewaschen und getrocknet wurde.

Während die so erhaltenen Niederschläge, ohne Flecken

zu hinterlassen, sublimierten, erwies sich die jeweils ungelöst gebliebene Substanz bei der Sublimationsprobe noch stark weinsäurehaltig.

Durch Wiederholung des Verfahrens mit diesen weinsäurehaltigen Substanzen ließen sich aufs neue wieder weinsäurefreie Zimtsäurefraktionen gewinnen. Schließlich schmolzen die aus der Sodalösung ausgefällten Niederschläge bei der Extraktion mit heißem Wasser zu einem Öl zusammen, das bei der heißen Filtration teilweise mit durchs Filter geht, wodurch die aus dem Filtrat abgeschiedenen Zimtsäuren weinsäurehaltig werden.

Ein Teil dieses Öles wurde durch Natronhydrat verseift. Die beim Ansäuern abgeschiedene Zimtsäure war inaktiv und gab bei der Krystallisation aus Äther die vollflächigen Zimtsäurekrystalle.

0,1588 g gaben 0,4251 CO_2 und 0,0788 H_2O.

Ber. für $C_9H_8O_2$		Gef.
C	72,97	73,00
H	5,41	5,51

In der angesäuerten Lösung wurde in der gewöhnlichen Weise die Weinsäure nachgewiesen.

Wie weiter unten gezeigt wird, hat das Dicinnamat die Eigenschaft, beim längeren Erhitzen mit Wasser zu einem Öl zusammenzuschmelzen, das schließlich durch das Wasser in aktive Zimtsäure und Monocinnamat gespalten wird.

Die das leichter lösliche Monocinnamat enthaltenden Lösungen wurden jedesmal nach der bereits mitgeteilten Methode auf dieses verarbeitet.

Die in der geschilderten Weise durch Extraktion mit heißem Wasser erhaltenen, weinsäurefreien, stark linksdrehenden Zimtsäurepräparate sind im folgenden beschrieben.

1. Präparat.

Weißes lockeres Krystallpulver, Schmelzpunkt 128°, sublimiert im Reagensrohr, ohne braunen Fleck zu hinterlassen, mit dem typischen Zimtsäuregeruch.

0,62 g in Soda gelöst — Vol. 10 ccm — drehte im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}80°$, d. i. $[\alpha]_D = -12{,}90°$.

0,3 g mit Natronlauge erwärmt $\alpha = 0{,}00°$. Reichte zur Verbrennung nicht mehr aus.

2. Präparat.

Krystallpulver von den gleichen Eigenschaften. Sublimiert ohne den geringsten Rückstand.

0,06 g in Soda gelöst — Vol. 10 ccm — drehte im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}12°$, d. i. $[\alpha]_D = -20°$, wurde in Natronhydratlösung inaktiv und gab bei der Analyse:

0,0930 g gaben 0,2486 CO_2 und 0,0470 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,90
H	5,41	5,65

3., 4. und 5. Präparat.

Eine größere Menge Cinnamatgemisch wurde zuerst in kalter Sodalösung etwa 2 Tage stehen gelassen und der beim Ansäuern sich abscheidende Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen und auf dem Dampfbade mit Wasser extrahiert; von der ungelöst gebliebenen Substanz heiß abfiltriert und das Filtrat rasch abgekühlt. Der sich abscheidende Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen und getrocknet, schmolz bei 126 bis 128°. Weinsäureprobe negativ.

0,2 g in 12 ccm Soda gelöst, $c = 1{,}66$, drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}48$, d. i. $[\alpha]_D = -14{,}5°$.

Analyse der bei 75° getrockneten Substanz.

0,1144 g gaben 0,3055 CO_2 und 0,0544 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,83
H	5,41	5,32

Der in Wasser ungelöst gebliebene Teil aufs neue in Soda gelöst, mit Salzsäure wieder abgeschieden, lieferte eine zur Analyse nicht ausreichende Menge Zimtsäure, die weinsäurefrei war und ein $[\alpha]_D = -15{,}5°$ besaß.

Bei der gleichen Behandlung der in Wasser ungelöst gebliebenen Substanz wurde eine etwas größere Menge Zimtsäure gewonnen, die bei 127 bis 130° schmolz und sich bei der Sublimation weinsäurefrei erwies.

0,2 g in 12 ccm Soda gelöst, $c = 1{,}66$, drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}43°$, d. i. $[\alpha]_D = -13°$.

0,1492 g gaben 0,3986 CO_2 und 0,0739 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,86
H	5,41	5,50

6. Präparat.

Aus einem anderen Cinnamatgemisch durch Lösen in kalter Soda, Ausfällen mit Salzsäure nach längerem Stehen und Ausziehen des Niederschlags mit heißem Wasser wurde ein bei

129 bis 130° schmelzendes Präparat erhalten. Weinsäureprobe negativ.

0,1 g in Soda gelöst — Vol. 5 ccm — im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}61°$, d. i. $[\alpha]_D = -15{,}2°$.

0,1010 g gaben 0,2699 CO_2 und 0,0504 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,88
H	5,41	5,57

7. Präparat.

Ein in gleicher Weise gewonnenes Präparat schmolz bei 132 bis 133° und erwies sich weinsäurefrei.

0,5 g in Soda gelöst — Vol. 17,5 ccm — drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}37°$, d. i. $[\alpha]_D = -6{,}4°$.

0,1066 g gaben 0,2846 CO_2 und 0,0525 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,81
H	5,41	5,47

Da alle bisher beschriebenen von ca. $[\alpha]_D = -2°$ bis $[\alpha]_D = -20°$ drehenden Zimtsäurepräparate bei der Verbrennung auf das genaueste für die Formel der Zimtsäure $C_9H_8O_2$ stimmende Werte geliefert haben, so müssen auch die Resultate der quantitativen Analyse als einwandfreier Beweis dafür gelten, daß die festgestellten Drehwerte auf optisch aktive Moleküle der verbrannten Zimtsäure zurückgeführt werden müssen, da sonst die Analysenwerte sehr merklich schwanken müßten, wie sich aus der Verbrennung eines Präparates ergibt, das bei der Sublimation nur noch einen ganz geringen braunen Ring hinterließ und 71,79% C (5,80% H) statt 72,97% C (5,41% H) lieferte.

Verhalten der aktiven Zimtsäurepräparate.

Zum Unterschied zu den früher durch die induzierende Wirkung von aktiver Phenylmilchsäure auf Zimtsäure beim Erwärmen des gemischten Zinksalzes (in alkoholischer Lösung) erhaltenen aktiven Zimtsäurepräparaten sind die durch die Weinsäurezimtsäureschmelze erhaltenen Präparate sehr viel beständiger.

Ein aus Cinnamatgemisch hergestelltes Präparat, das bei der Sublimationsmethode sich frei von Weinsäure erwies und

bei 129 bis 130° schmolz, wurde in verdünnter Soda gelöst, $c = 1{,}33$, 2-dcm-Rohr und drehte

nach 15 Minuten $\alpha = -0{,}70°$
$-0{,}73°$
$-0{,}72°$
nach 24 Stunden $\alpha = -0{,}70°$
$-0{,}71°$
nach 48 Stunden $\alpha = -0{,}71°$
$-0{,}71°$
nach 72 Stunden $\alpha = -0{,}71°$
$-0{,}71°$, d. i. $[\alpha]_D = -26{,}69°$.

Die Aktivität verschwand aber nach kürzester Zeit auf Zusatz von ein paar Tropfen Natronlauge und blieb bei 0,00 stehen.

Auch gegen heißes Wasser ist die Aktivität recht beständig, wie sich schon aus der Gewinnung der Präparate durch Krystallisation aus heißem Wasser auf dem Wasserbad ergibt

Eine vollständige Inaktivierung findet erst statt bei längerem Kochen mit Wasser. Ein später zu beschreibendes Präparat, das genau stimmende Analysenwerte lieferte und den Drehwert $[\alpha]_D = -13{,}8°$ besaß, wurde ca. 2 Stunden in wässeriger Lösung gekocht. Die in der Kälte sich abscheidende Zimtsäure wurde mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung war inaktiv, ebenso die wässerige Lösung nach dem Eindampfen auf ein kleines Volumen.

0,3 g des vorhin beschriebenen und analysierten Präparates von $[\alpha]_D = -6{,}4°$ wurden in 35 ccm Wasser 4 Minuten gekocht. Die in der Kälte ausgeschiedene Zimtsäure drehte nach der Extraktion mit Äther noch $[\alpha]_D = -6{,}0°$. Die nach dem Verjagen des Äthers hinterbleibende Zimtsäure wurde aufs neue 45 Minuten gekocht und drehte danach in ätherischer Lösung noch $[\alpha]_D = -2{,}7°$. Erst nach weiterem 1 stündigen Kochen drehte die ätherische Lösung $[\alpha]_D = 0{,}00$. Desgleichen die wässerige Lösung.

0,3 g derselben Säure wurden mit Wasser und einigen Tropfen Natronlauge 3 Minuten gekocht und zeigte dann im 2-dcm-Rohr

$$[\alpha]_D = 0{,}00.$$

Inaktivierung der Linkszimtsäure durch Sublimation.

0,3 g Zimtsäure von einem $[\alpha]_D = -5{,}40°$ wurden auf 14 trockene Reagensgläser gleichmäßig verteilt und die Zimtsäure nach der oben angegebenen Sublimationsmethode subli-

miert. In keinem Reagensrohr blieb auch nur eine Spur braunen Rückstandes. Die Sublimate wurden sodann mit Äther aufgenommen und polarisiert. Die ätherische Lösung — Vol. 25 ccm — drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = 0{,}00$.

Danach findet also auch bei der Sublimation der Linkszimtsäure eine vollständige Inaktivierung statt.

10. Beweis für die Verseifbarkeit der Cinnamate durch kalte Sodalösung sowohl als durch heißes Wasser.

Die im letzten Abschnitt beschriebene Methode der Darstellung stark linksdrehender Zimtsäurepräparate durch Extraktion des aus der Sodalösung des Cinnamatgemisches gefällten, aus Dicinnamat und Zimtsäure bestehenden Niederschlages mit heißem Wasser beruht, wie aus den im folgenden beschriebenen Versuchen ersichtlich ist, nur zum Teil auf der vorhergegangenen, unvollständigen Verseifung des Dicinnamats durch kalte Sodalösung, in zweiter Linie aber wirkt, bei der Extraktion der durch die Soda abgespaltenen Zimtsäure mit heißem Wasser, dieses ebenfalls verseifend auf das im Niederschlag noch enthaltene Dicinnamat ein, so daß die nach der beschriebenen Methode gewonnene Linkszimtsäure ihre Entstehung einerseits der Verseifung durch die Soda, andererseits der verseifenden Wirkung des heißen Wassers zu verdanken hat.

Verseifung des Dicinnamats durch die alleinige Wirkung der kalten Sodalösung.

6 g Cinnamatgemisch wurden in Soda gelöst, filtriert und sofort mit Salzsäure gefällt und der aus Dicinnamat bestehende Niederschlag abfiltriert und ausgewaschen. Aus dem Filtrat wurde das bereits oben beschriebene Monocinnamat vom Zersetzungspunkt 188° und dem Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -16{,}6°$ gewonnen.

Der aus Dicinnamat bestehende Niederschlag wurde aufs neue in Soda gelöst und die Lösung in der Kälte 5 Tage stehen gelassen. Der nach dieser Zeit durch Salzsäure gefällte Niederschlag wurde auf Ton getrocknet und sodann mit Ligroin verrieben und ausgezogen. Beim Erkalten schied sich prächtige β-Zimtsäure ab. Weinsäureprobe negativ.

0,3 g in 15 ccm Sodalösung, $c = 2$, 2-dcm-Rohr, $\alpha = -0{,}50°$, d. i. $[\alpha]_D = -12°$.

0,1518 g gaben 0,4053 CO_2 und 0,0768 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,81
H	5,41	5,54

Diese Zimtsäure hat also ihre Entstehung ganz allein der Verseifung des Dicinnamats durch die kalte Sodalösung zu verdanken.

Der in Ligroin unlösliche Teil des Niederschlags hatte die Eigenschaften des einheitlichen Dicinnamats.

Aus dem Filtrat des Niederschlags konnte nach der früher mitgeteilten Methode das charakteristische, krystallinische Monocinnamat vom Z.-P. 188° abgeschieden werden.

Durch Erhitzen mit Wasser auf dem Dampfbad bewirkte Verseifung der Cinnamate.

Versuch 1.

3 g eines an Dicinnamat reichen Cinnamatgemisches wurden mit Wasser 5 Stunden auf dem Dampfbad erhitzt. Die Substanz schmilzt zuerst unter Wasser und ging bis auf eine ganz geringe Menge zähen Öls in Lösung. Nach Filtration durch ein nasses Faltenfilter schied sich die durch Wasserverseifung entstandene Zimmtsäure beim Erkalten krystallinisch ab. Nach nochmaliger Krystallisation aus heißem Wasser auf dem Dampfbad schmolz sie bei 130 bis 133°, war weinsäurefrei und gab bei der Polarisation und der Analyse die folgenden Werte:

0,31 g in 11 ccm, $c = 2{,}8$, 1-dcm-Rohr, $\alpha = -0{,}13°$, d. i. $[\alpha]_D = -4{,}60°$.

0,1258 g gaben 0,3368 CO_2 und 0,0626 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	73,01
H	5,41	5,56

Versuch 2.

3 g eines nach einer unten beschriebenen Methode dargestellten einheitlichen Dicinnamats wurden 12 Stunden auf dem Dampfbad mit ca. 400 ccm Wasser erhitzt. Das Dicinnamat schmilzt unter Wasser zu einem hellgelben durchsichtigen Öl, das, der allmählich fortschreitenden Zersetzung durch das Wasser entsprechend, immer mehr an Menge abnimmt. Nach

12 Stunden wurde von unverändertem Öl durch ein feuchtes Filter getrennt. Die beim Erkalten abgeschiedenen 0,8 g Zimtsäure wurden nochmals aus heißem Ligroin umkrystallisiert. Weinsäureprobe negativ. Schmelzpunkt 129 bis 131°.

0,15 g in 13 ccm Soda, $c = 1{,}1$, 2-dcm-Rohr, $\alpha = -0{,}18°$, d. i. $[\alpha]_D = -8°$.

0,1273 g gaben 0,3398 CO_2 und 0,0646 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,79
H	5,41	5,71

Aus dem wässerigen Filtrat der Zimtsäure wurde in bekannter Weise das Monocinnamat vom Z.-P. 188 abgeschieden, das bei allen Verseifungen des Dicinnamats, seiner großen Beständigkeit entsprechend, als Zwischenprodukt auftritt, das aber, wie der folgende Versuch zeigt, beim Erhitzen mit Wasser schließlich auch der Verseifung unterliegt.

Verseifung von Monocinnamat.

Wie bereits erwähnt, fällt das Monocinnamat aus Sodalösung nur bei großer Konzentration der Lösung auf Zusatz von verdünnter Salzsäure zum Teil wieder aus. Eine solche Probe wurde mit der zugesetzten Salzsäure etwa 3 Stunden auf dem Dampfbad erhitzt. Die so erhaltene, in der Hitze klare Lösung wurde heiß filtriert und so von einer geringen Menge eines zähen öligen Produktes getrennt. Beim Erkalten scheidet sich krystallinische Zimtsäure ab.

0,14 g in 12 ccm Sodalösung, $c = 1{,}16$, 2-dcm-Rohr, $\alpha = -0{,}13$, d. i. $[\alpha]_D = -5{,}6°$.

Die Sodalösung war nach 10 Minuten langem Kochen inaktiv.

0,1201 g gaben 0,3198 CO_2 und 0,0567 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,62
H	5,41	5,28

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die Cinnamate sowohl durch Soda in der Kälte als durch Erhitzen mit Wasser auf dem Dampfbad unter Abscheidung linksdrehender Zimtsäurepräparate verseifbar sind. Besonders bemerkenswert ist es, daß die abgespaltene Zimtsäure ihre Aktivität bei dem 2. Versuch selbst nach 12stündigem Erhitzen mit Wasser auf dem Dampfbad nicht eingebüßt hat.

11. Zweckmäßigere Aufarbeitungsmethode der Weinsäure-Zimtsäureschmelze.

Da die Erfahrung gelehrt hat, daß das kolloidale Dicinnamat, das, wenn wasserfrei, amorph glasig oder porzellanartig und zerreiblich ist, bei Berührung mit Wasser solches aufnimmt und dabei klebrig wird, so empfiehlt es sich, die Aufarbeitung der Schmelze unter Verwendung von Wasser, so wie es bei dem folgenden Versuch beschrieben wird, vorzunehmen.

Ein Gemisch von 20 g Zimtsäure und 20 g Weinsäure wurde unter Umrühren 1 Stunde auf 168 bis 170° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Schmelzgefäß zertrümmert, die Schmelze gepulvert und sodann mit 250 ccm Ligroin 20 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt und die Lösung heiß filtriert. Beim Erkalten schieden sich 5 g blendendweiße β-Zimtsäure aus.

0,5 g in Soda gelöst — Vol. 25 ccm — drehten in 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}10°, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -2{,}5°.$$

Die Schmelze wurde noch zweimal mit der Ligroinmutterlauge in der Hitze ausgezogen und lieferte noch 2,4 g Zimtsäure, die, in Soda gelöst, etwas schwächer drehte. Daraus ergibt sich, daß die Hauptmenge der in Ligroin leichter löslichen Linkszimtsäure bereits bei dem ersten Auszug in Lösung geht.

Da bei weiterer Extraktion nur mehr Spuren von Zimtsäure in Lösung gingen, wurde der verbleibende in Ligroin unlösliche Rückstand, der die Cinnamate und unangegriffene Weinsäure enthält, zur Aufnahme der Cinnamate mit trockenem Äther am Rückflußkühler erhitzt und die ätherische Lösung von der ungelöst zurückbleibenden Weinsäure getrennt.

Die das Cinnamatgemisch enthaltende ätherische Lösung hinterließ nach dem Abdestillieren des Äthers und weiterem Erhitzen des Rückstandes im offenen Gefäß auf dem Dampfbad zur Verflüchtigung der letzten Reste des Äthers eine honigartige Substanz, die nur geringe Mengen von Krystallen erkennen ließ und die nach Art der Dicinnamatpräparate beim Erkalten zu einer weißen porzellanartigen Masse erstarrte, deren Gewicht 21 g betrug.

Die in Äther unlöslich zurückgebliebene Substanz besaß die Eigenschaften der Metaweinsäure und löste sich bis auf einen geringen Niederschlag in Wasser. Der Niederschlag löste sich beim Schütteln mit Äther.

Die ätherische Lösung — Vol. 86 ccm — drehte in 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}12$$

und hinterließ beim Verdunsten 0,5 g Substanz von den Eigenschaften des Cinnamatgemisches, die der vorherigen Extraktion mit Äther entgangen war.

Die wässerige Lösung — Vol. 240 ccm — drehte im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = +0{,}43^0;\ \text{d. i. } [\alpha]_D = +9{,}4^0$$

und hinterließ nach dem Eindampfen 5,4 g sirupöse Metaweinsäure, aus der dann in der bekannten Weise die gewöhnliche Weinsäure regeneriert werden konnte.

Die hier geschilderte Trennungsmethode der einzelnen Bestandteile der Weinsäure-Zimtsäureschmelze ist, nachdem durch die vorhergegangenen Versuche die Natur dieser Bestandteile ermittelt wurde, der vorher beschriebenen Methode entschieden vorzuziehen.

Die bisher mitgeteilten Versuche haben ergeben, daß bei den Zimtsäure-d-Weinsäureschmelzen unter den angegebenen Bedingungen ein relativ kleiner Teil der verschmolzenen Zimtsäure, der sich aus der trockenen Schmelze mit Ligroin, in dem alle sonst vorhandenen Substanzen ganz unlöslich sind, extrahieren läßt, durch die asymmetrische Induktion der d-Weinsäure linksdrehend wird, während ein anderer Teil der Zimtsäure mit der Weinsäure den beiden Gleichungen entsprechend:

1. $$\begin{array}{l} \mathrm{COOH} \\ | \\ \mathrm{CHOH} \\ | \\ \mathrm{CHOH} \\ | \\ \mathrm{CHOH} \end{array} + \mathrm{C_6H_5CH{=}CH{-}COOH} = \begin{array}{l} \mathrm{COOH} \\ | \\ \mathrm{CH{-}OCO{-}CH{=}CH{-}C_6H_5} \\ | \\ \mathrm{CHOH} \\ | \\ \mathrm{CHOH} \end{array} + \mathrm{H_2O}$$

2. $$\begin{array}{l} \mathrm{COOH} \\ | \\ \mathrm{CHOH} \\ | \\ \mathrm{CHOH} \\ | \\ \mathrm{COOH} \end{array} + \begin{array}{l} \mathrm{C_6H_5{-}CH{=}CH{-}COOH} \\ \mathrm{C_6H_5{-}CH{=}CH{-}COOH} \end{array} = \begin{array}{l} \mathrm{COOH} \\ | \\ \mathrm{CHOCOCH{=}CH{-}C_6H_5} \\ | \\ \mathrm{CHOCOCH{=}CH{-}C_6H_5} \\ | \\ \mathrm{COOH} \end{array} + 2\,\mathrm{H_2O}$$

unter Wasserabspaltung und Bildung von wechselnden Gemischen des Mono- und Dicinnamats der Weinsäure in Reaktion tritt, die, wie gezeigt, durch Sodalösung getrennt werden können.

Bei längerem Stehen wirkt die Sodalösung in der Kälte verseifend auf die Cinnamate ein, ebenso Wasser bei mehrstündigem Erhitzen auf dem Dampfbad.

Die durch die Verseifung entstehenden Zimtsäurepräparate sind durchweg stark linksdrehend. Lassen sich die Präparate in der oben beschriebenen Weise im Reagensrohr sublimieren ohne Hinterlassung eines braunen Fleckes oder Ringes, so sind sie als frei von Cinnamaten zu betrachten und liefern alsdann auf das genaueste stimmende Analysenwerte.

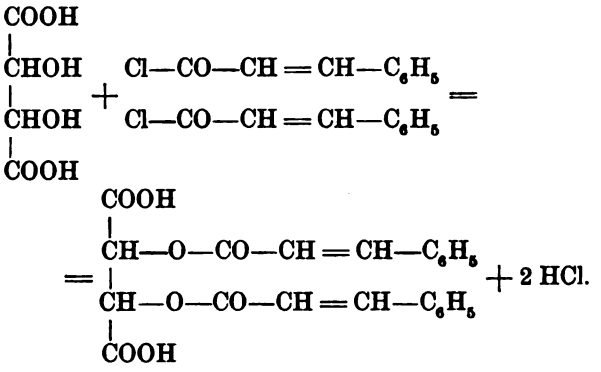
Im Falle der Anwesenheit von Spuren Cinnamat jedoch hinterlassen die Präparate bei der Sublimation einen kleinen braunen Fleck oder Ring und liefern bei der Verbrennung zu niedrige Werte.

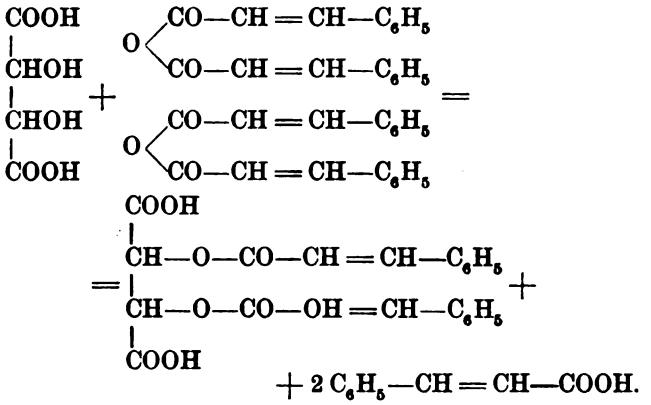
Da die Cinnamate im heißen Ligroin absolut unlöslich sind, so ist es nur nötig, solche Präparate nochmals aus heißem Ligroin zu krystallisieren. Die etwa noch vorhandenen kleinen Mengen von Cinnamat bleiben unlöslich zurück und aus der filtrierten Ligroinlösung scheidet sich die aktive Zimtsäure rein ab mit dem ihr eigenen Drehungsvermögen.

Reine linksdrehende Zimtsäure verliert ihre Aktivität nicht nur durch Sublimation, sondern auch durch längeres Kochen mit Wasser und besonders leicht schon in der Kälte durch einige Tropfen Natronlauge und unterscheidet sich dadurch sehr wesentlich von den optisch aktiven Substanzen, bei denen die Aktivität von dem Vorhandsein asymmetrischer Kohlenstoffatome herrührt, die unter den genannten Bedingungen ihre Aktivität beibehalten.

Da man die höherdrehenden Zimtsäurepräparate am besten durch Verseifung aus dem Dicinnamat erhält, das bei der Zimtsäure-Weinsäureschmelze nur in schlechter Ausbeute entsteht, so war es wünschenswert, dieses Präparat nach anderen Methoden in besserer Ausbeute zu gewinnen.

Nachdem bereits die freie Zimtsäure in der Schmelze mit Weinsäure zu einem gewissen Betrage in Dicinnamat verwandelt wird, durfte erwartet werden, daß sowohl das Zimtsäurechlorid, als das Zimtsäureanhydrid den folgenden Gleichungen entsprechend mit der Weinsäure annährend quantitativ in Reaktion treten:

1. 

2. 

Im folgenden wird gezeigt, daß man der Gleichung 1 entsprechend leicht zu einheitlichem Dicinnamat gelangen kann. Beim Verschmelzen von 2 Mol.-Gew. Zimtsäureanhydrid und 1 Mol.-Gew. Weinsäure erhält man aber, wie es die Gleichung 2 voraussehen läßt, quantitativ neben 1 Molekül Dicinnamat 2 Moleküle Zimtsäure. Von hervorragendem Interesse ist es, daß die 2 Moleküle Zimtsäure, die mit dem Weinsäuremolekül gar nicht in Verbindung getreten sind, durch asymmetrische Induktion optisch aktiv sind, und zwar wurde bei einer länger dauernden Schmelze Zimtsäure von dem $[\alpha]_D = -13^0$ erhalten.

Diese Methode eignet sich daher am besten dazu, um rasch zu aktiver Zimtsäure zu gelangen.

Sie wurde deshalb auch dazu benutzt, um aus l-Weinsäure und inaktivem Zimtsäureanhydrid die Rechtszimtsäure darzustellen.

12. Quantitative Darstellung des Dicinnamats der d-Weinsäure durch Verschmelzen von 2 Mol.-Gew. Zimtsäurechlorid und 1 Mol.-Gew. d-Weinsäure.

Zur quantitativen Gewinnung des Dicinnamats der d-Weinsäure erhitzt man ein inniges Gemisch von 2 Mol.-Gew. Zimtsäurechlorid und 1 Mol.-Gew. d-Weinsäure allmählich auf 168°. Bereits bei 100° tritt Reaktion ein unter lebhafter Salzsäuregasentwicklung. Es bildet sich eine dunkelgelb gefärbte, zähe Schmelze, die nach einer halben Stunde klar und durchsichtig wird. Die Schmelze wurde $1^1/_2$ Stunde auf 168° erhitzt.

Nach dem Erkalten wird die Schmelze hart und läßt sich nach Zertrümmerung des Schmelzgefäßes in trockenen, durchsichtigen, bernsteinfarbigen Stücken gewinnen, die sich leicht pulvern lassen. Die Substanz schmilzt bei 71 bis 75°.

Als Beleg dafür, daß die Reaktion quantitativ der obigen Gleichung entsprechend verlaufen ist, wurde eine Probe der Schmelze wie die Weinsäure-Zimtsäureschmelze mit Wasser und Äther behandelt. Das entstandene Dicinnamat geht vollständig in die ätherische Lösung. Die wässerige Flüssigkeit zeigt nicht die Spur von Rechtsdrehung und ist daher frei von Weinsäure, die danach bei der Reaktion vollständig zur Bildung des Dicinnamats verbraucht worden ist.

0,3 g in 15 ccm Sodalösung, $c = 2$, drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -4{,}09°$, d. i. $[\alpha]_D = -102°$.

Drehung in Äther schwächer: 0,23 g in 15 ccm Äther, $c = 1{,}5$, $\alpha = -2{,}00°$, d. i. $[\alpha]_D = -66{,}6°$.

0,1549 g gaben 0,3618 CO_2 und 0,0637 H_2O.

Ber. für $C_{22}H_{18}O_8$		Gef.
C	64,39	63,70
H	4,39	4,56

Danach muß sich bei der Schmelze etwas Zimtsäure verflüchtigt haben, was auch durch das Vorhandensein einer geringen Menge sublimierter Zimtsäure bestätigt wird.

Das so erhaltene bernsteinartige Dicinnamat ist nur wenig hygroskopisch, hat aber die Eigentümlichkeit, bei der Berührung mit Wasser stark klebrig zu werden. Bei längerem Trocknen bei 75° verliert es das Wasser wieder unter gleichzeitigem Schmelzen und wird dann beim Erkalten wieder hart und glasig.

Es löst sich wie die früheren Präparate vollständig in Soda. Der nach mehrtägigem Stehen der Sodalösung mit Salz-

säure ausgefällte Niederschlag lieferte beim Ausziehen mit heißem Wasser auf dem Dampfbad völlig farblose, linksdrehende Zimtsäure vom Schmelzpunkt 129 bis 133°. Weinsäureprobe negativ.

0,2 g in 25 ccm Sodalösung, $c = 0{,}8$, 1-dcm-Rohr
$\alpha = -0{,}11°$, d. i. $[\alpha]_D = -13{,}8°$.

0,1100 g gaben 0,2943 CO_2 und 0,0546 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,97
H	5,41	5,55

Es ist dies das gleiche Präparat, das nach längerem Kochen mit Wasser sowohl als bei der Behandlung mit ein paar Tropfen Natronlauge inaktiv wurde.

18. Bildung von l-Zimtsäure neben l-Dicinnamat beim Verschmelzen von 2 Mol.-Gew. Zimtsäureanhydrid und 1 Mol.-Gew. d-Weinsäure.

Die Versuche, Zimtsäureanhydrid mit Weinsäure im obigen Verhältnis zu verschmelzen, haben ergeben, daß bei unvorsichtigem Erhitzen der feingepulverten und innig gemischten Substanzen bei ca. 150° unter plötzlichem Ansteigen der Temperatur über 170° eine anormale Reaktion eintreten kann, die starke Braunfärbung und Dünnflüssigwerden der Schmelze zur Folge hat, unter gleichzeitigem Auftreten von Brenztraubensäuredämpfen. Treten diese Erscheinungen auf, so hat man die Schmelze als verloren zu betrachten.

Bei normal verlaufendem Schmelzen nimmt das zuerst geschmolzene Zimtsäureanhydrid bei fortgesetztem Umrühren und bei langsamem Erhitzen auf 150° die am Boden des Gefäßes befindliche Weinsäure unter geringem Perlen ganz allmählich auf.

Die entstehende gleichmäßige Schmelze ist dickflüssig und nur wenig gelb gefärbt. Man läßt zweckmäßig die Schmelze erst noch einige Zeit bei dieser Temperatur gehen und steigert sie dann allmählich auf 168 bis 170°. Ein spontanes Steigen der Temperatur ist dann nicht mehr zu befürchten.

Bei den verschiedenen Versuchen gelang es, die Schmelze längere Zeit, bei einem Versuche sogar 2 Stunden, bei der Temperatur 168° zu halten, ohne daß Zersetzung eintrat.

Beim Abkühlen erstarrt die Schmelze zu einer festen, dem

Meerschaum ähnlichen farblosen Masse, die jedoch im Innern krystallinische Struktur besitzt.

Zur weiteren Verarbeitung zertrümmert man zweckmäßig das Schmelzgefäß und extrahiert dann die fein gepulverte Schmelze so lange mit Ligroin auf dem Dampfbad, bis nichts mehr in Lösung geht. Das in Ligroin unlösliche Dicinnamat bleibt dann als schwach gelblich gefärbte, glasige Masse zurück. Erst wenn dieser Punkt erreicht ist, kann man annehmen, daß die bei der Reaktion gebildete freie Zimtsäure fast vollständig ausgezogen ist. Um ganz sicher zu gehen, kann man das Dicinnamat in kalter Soda lösen und nach Filtration durch ein nasses Filter mit verdünnter Salzsäure ausfällen. Aus dem so erhaltenen Niederschlag lassen sich dann nach dem Trocknen noch geringe Mengen von Zimtsäure durch Ligroin ausziehen.

Versuch 1.

26 g Zimtsäureanhydrid und 7 g Weinsäure wurden in der angegebenen Weise allmählich auf 170° erhitzt und 1 Stunde bei dieser Temperatur gehalten.

Um festzustellen, ob alle Weinsäure in Reaktion getreten ist, wurde die gepulverte Schmelze in einem Gemisch von Wasser und Äther gelöst. Die ätherische Lösung drehte, nachdem sie nochmals mit Wasser durchgeschüttelt worden war, im 2-dcm-Rohr $\alpha = -12{,}42°$.

Da die Schüttelwasser nach links drehten, wurden sie ausgeäthert und lieferten 72 ccm einer ätherischen Lösung, die im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}20°$ drehte, während die ausgeätherte wässerige Flüssigkeit nach dem Eindampfen auf ein kleines Volumen inaktiv war.

Danach wird bei der Schmelze alle d-Weinsäure in ätherlösliche, linksdrehende Substanz umgewandelt.

Die ätherische Lösung wurde sodann durch Abblasen verdunstet und der Krystallbrei scharf abgesaugt.

Die abgesaugte Substanz wog lufttrocken 20 g.

10 g wurden mit Ligroin ausgezogen, bis amorphes, glasiges Dicinnamat zurückblieb. Aus der Ligroinlösung schieden sich 5,7 g farblose, weinsäurefreie Zimtsäure in ihrer β-Form aus, d. i. auf 20 g berechnet 11,4 g, während nach obiger Gleichung 13,8 g zu erwarten waren.

Die gewonnene Zimtsäure, die den richtigen Schmelzpunkt zeigt, ist links drehend:

0,5 g in Sodalösung — Vol. 15 ccm — drehten im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}18°$, d. i. $[\alpha]_D = -5{,}40°$.

0,1087 g gaben 0,2908 CO_2 und 0,0514 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,96
H	5,41	5,25

Ihre Lösung in Soda war nach dem Kochen mit Natronlauge inaktiv.

Die anderen 10 g wurden mit Wasser auf dem Dampfbad extrahiert und von dem ungelöst gebliebenen Dicinnamat heiß filtriert.

Aus der heißen Lösung schieden sich 2,8 g weinsäurefreie Zimtsäure aus.

0,5 g in Soda gelöst — Vol. 15 ccm — drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}50°$, d. i. $[\alpha]_D = -7{,}3°$.

0,1061 g gaben 0,2835 CO_2 und 0,0529 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,87
H	5,41	5,54

Eine weitere Extraktion lieferte Zimtsäure, die sich bei der Sublimation weinsäurehaltig erwies und bei der Verbrennung 71,33 C und 4,90 H lieferte. Die Substanz wurde deshalb aus Ligroin umkrystallisiert, wobei Dicinnamat in seiner charakteristischen, glasigen Form in geringer Menge zurückblieb. Die ausgeschiedene Säure war weinsäurefrei.

0,2 g in Sodalösung — Vol. 15 ccm — drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}16°$, d. i. $[\alpha]_D = -6°$.

0,1051 g gaben 0,2810 CO_2 und 0,0499 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,92
H	5,41	5,28

Die abgesaugte Flüssigkeit stellte ein honiggelbes Öl vor, neben etwas Wasser. Beim Trocknen auf dem Wasserbad gehen die letzten Anteile des Äthers und des Wassers unter Blasenbildung weg. Nach 1stündigem Trocknen auf dem Wasserbad erstarrt die Substanz zu einer porzellanartigen, elfenbeinfarbigen spröden Masse.

0,5 g in Soda gelöst — Vol. 20 ccm — drehten im 1-dcm-Rohr $\alpha = -2{,}55°$, d. i. $[\alpha]_D = -102°$.

Die Substanz hat keinen scharfen Schmelzpunkt, sondern wird, wie alle Dicinnamatpräparate, bereits bei 75° weich.

Bei der Verbrennung wurden die für Dicinnamat berechneten Werte erhalten.

1. 0,1060 g gaben 0,2495 CO_2 und 0,0490 H_2O.
2. 0,1227 g „ 0,2902 CO_2 „ 0,0575 H_2O.

Ber. für $C_{22}H_{18}O_6$		Gef. 1	Gef. 2
C	64,39	64,13	64,51
H	4,39	5,13	5,21

Aus dem bei der Zimtsäureanhydridschmelze erhaltenen Dicinnamat läßt sich in der früher angegebenen Weise durch Verseifung mit Soda und heißem Wasser leicht linksdrehende Zimtsäure gewinnen. Ein auf diese Weise gewonnenes Präparat, das bei 130 bis 131° schmolz und sich bei der Sublimation weinsäurefrei erwies, gab bei der Drehung:

0,3 g in 12 ccm Sodalösung, $c = 2{,}5$, 2-dcm-Rohr
$\alpha = -0{,}35°$, d. i. $[\alpha]_D = -7°$

und bei der Analyse:

0,1162 g gaben 0,3109 CO_2 und 0,0571 H_2O.

Ber. für $C_9H_8O_2$		Gef.
C	72,97	72,97
H	5,41	5,58

Besonders bemerkenswert ist bei diesem Versuche, daß die bei der Einwirkung von Zimtsäureanhydrid auf Weinsäure freiwerdende Zimtsäure so hohe Aktivität zeigt.

Versuch 2.

Bei diesem Versuch wurden die gleichen Mengen von Zimtsäureanhydrid und Weinsäure verschmolzen und die klare, kaum gefärbte Schmelze 1 Stunde auf 170° erhitzt. Beim Ausziehen der Schmelze mit heißem Ligroin wurden statt 14,8 13 g Zimtsäure gewonnen, die bei 130 bis 133° schmolz und bei der Sublimation keine Weinsäure mehr erkennen ließ.

Die Polarisation und die Analyse lieferte die folgenden Resultate:

0,5 g in 15 ccm Sodalösung, $c = 3{,}3$, drehten im 2-dcm-Rohr
$\alpha = -0{,}60°$, d. i. $[\alpha]_D = -9°$.

0,1533 g gaben 0,4099 CO_2 und 0,0775 H_2O.

Ber. für $C_9H_8O_2$		Gef.
C	72,97	72,92
H	5,41	5,61

Versuch 3.

Bei diesem Versuch wurden 3 g d-Weinsäure mit 11,1 g Zimtsäureanhydrid langsam erhitzt. Bei ca. 150° ging die Weinsäure beim Umrühren allmählich ganz in die Schmelze ein, die dann noch 2 Stunden auf 165 bis 168° erhitzt wurde.

Bei der Extraktion der Schmelze mit Ligroin wurden 5,6 g statt der berechneten 5,9 g Zimtsäure erhalten, die bei 128 bis 131° schmolz und bei der Sublimation keine Weinsäure mehr erkennen ließ.

0,5 g in 20 ccm Sodalösung, $c = 2{,}5$, drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}67°$, d. i. $[\alpha]_D = -13{,}4°$.

0,1510 g gaben 0,4030 CO_2 und 0,0747 H_2O.

	Ber. für $C_9H_8O_2$	Gef.
C	72,97	72,92
H	5,41	5,49

Das in Ligroin unlösliche Dicinnamat wurde bei 75° getrocknet und stellte nach dem Erkalten eine glasige harte Substanz vor.

0,3 g in 20 ccm Sodalösung, $c = 1{,}5$, drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -2{,}62°$, d. i. $[\alpha]_D = -87{,}3°$.

Die Analyse lieferte 65,98 C und 5,33 H, während sich für Dicinnamat 64,3 g C und 4,39 H berechnet.

Danach mußte angenommen werden, daß die Substanz noch Zimtsäure enthielt.

Nach erneuter Extraktion wurde das ungelöst gebliebene Dicinnamat nach 3tägigem Trocknen bei 75 bis 80° von neuem polarisiert und analysiert.

0,3 g in 20 ccm Sodalösung, $c = 1{,}5$, drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = -3{,}25°$, d. h. $[\alpha]_D = -108°$.

0,1531 g gaben 0,3582 CO_2 und 0,0606 H_2O.

	Ber. für $C_{22}H_{18}O_8$	Gef.
C	64,39	63,80
H	4,39	4,39

Das zweite analysierte Präparat, das 1,59% zuviel Kohlenstoff gab, muß, da 1% Zimtsäure in Dicinnamat 0,08% Kohlenstoff zuviel bewirkt, ca. 20% Zimtsäure, entsprechend 1,60% zuviel Kohlenstoff, enthalten haben.

In den 0,3 g der zur Polarisation benutzten Substanz mußten danach 0,06 g Zimtsäure enthalten gewesen sein von dem $[\alpha]_D = -13°$. In den 20 ccm Flüssigkeit, die zu der Polari-

sation benutzt wurden, berechnet sich die Zimtsäurekonzentration zu 0,3 g.

Der dieser Zimtsäurekonzentration entsprechende Winkel α berechnet sich aus der Gleichung

$$\frac{100 \cdot x}{2 \cdot 0{,}3} = 13 \quad \text{oder} \quad x = \alpha = 0{,}07^0.$$

Gefundener Winkel	$\alpha = -2{,}62^0$
Davon ab für Zimtsäure . .	$\alpha = -0{,}07^0$
Bleibt für Dicinnamat . . .	$\alpha = -2{,}55^0$

Von den angewandten 0,3 g polarisierter Substanz mußten nach dem Resultat der Analyse 0,06 g Zimtsäure sein, somit bleibt für Dicinnamat 0,24 g. Diese entsprechen einer Dicinnamatkonzentration von $c = 1{,}2$.

Somit berechnet sich mit Berücksichtigung der Analyse nach Abzug der Zimtsäure für das in den 0,3 g enthaltene Dicinnamat:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \cdot 2{,}55}{2 \cdot 1{,}2} = \frac{255}{2{,}4} = -106^0,$$

statt der beim Versuch gefundenen -108^0, eine Übereinstimmung, wie sie kaum besser erwartet werden kann.

14. Bildung von d-Zimtsäure neben d-Dicinnamat beim Verschmelzen von 2 Mol.-Gew. Zimtsäureanhydrid und 1 Mol.-Gew. l-Weinsäure.

Die bei den bisher ausgeführten d-Weinsäure-Zimtsäureanhydridschmelzen gesammelten Erfahrungen haben ergeben, daß je nach den Versuchsbedingungen die bei der Umsetzung von d-Weinsäure und Zimtsäureanhydrid entstehenden Zimtsäurepräparate verschiedene Drehwerte besitzen.

Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurde deshalb zugleich mit der Schmelze der sehr teueren l-Weinsäure eine Kontrollschmelze mit der d-Weinsäure in dem gleichen Mengenverhältnis und unter genau gleichen Bedingungen ausgeführt.

Die beiden von Kahlbaum bezogenen Präparate von l- bzw. d-Weinsäure wurden vorher auf ihr Drehungsvermögen untersucht.

In 0,3 g der l- sowie der d-Weinsäure in Wasser gelöst — Vol. 10 ccm — drehten im 2-dcm-Rohr:

l-Weinsäure:	d-Weinsäure:
$\alpha = -\ 0{,}86^0$	$\alpha = +\ 0{,}86^0$
$[\alpha]_D = -\ 14{,}3^0$	$[\alpha]_D = +\ 14{,}3^0$.

Die Präparate drehen also gleich viel, jedoch in entgegengesetzter Richtung.

3,0 g l- bzw. d-Weinsäure wurden mit je 11,1 g Zimtsäureanhydrid innig gemischt in 2 Reagensröhren in ein und demselben Bad zuerst vorsichtig auf 150° erhitzt. Nachdem bei dieser Temperatur die Weinsäure beim Umrühren von der Zimtsäureanhydridschmelze aufgenommen war, wurden die Schmelzen langsam auf 170° erhitzt und 1 Stunde bei dieser Temperatur gehalten.

Nach dieser Zeit erstarrten die beiden Schmelzen beim Abkühlen zu einer fast weißen, meerschaumähnlichen, harten Masse.

Die fein gepulverten Schmelzen wurden nunmehr mit je 250 ccm Ligroin $^1/_2$ Stunde auf dem Dampfbad extrahiert.

Beim Erkalten schieden sich

a) aus der der l-Weinsäure entsprechenden Ligroinlösung 3,2 g Zimtsäure vom F.-P. 133° aus. Weinsäureprobe negativ.

0,5 g in Sodalösung — Vol. 20 ccm — drehten im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = +\ 0{,}26^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = +\ 5{,}2^0.$$

0,1106 g gaben 0,2957 CO_2 und 0,0544 H_2O.

Ber. f. $C_9H_8O_2$	Gef.
C 72,97	72,92
H 5,41	5,48

b) aus der der d-Weinsäure entsprechenden Ligroinlösung 2,3 g Zimtsäure F.-P. 133° aus. Weinsäureprobe negativ.

0,5 g in Sodalösung — Vol. 20 ccm — im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -\ 0{,}26^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -\ 5{,}2^0.$$

Bei erschöpfender Extraktion mit Ligroin wurden einschließlich der in der Ligroinmutterlauge gelösten Zimtsäure aus der Schmelze mit

l-Weinsäure	d-Weinsäure
5,6 g	5,0 g

Zimtsäure gewonnen statt der berechneten 5,9 g.

Die Menge des in Ligroin unlöslichen Dicinnamats betrug bei dem Versuch mit

l-Weinsäure	d-Weinsäure
7,4 g	8,1 g

statt der nach der Gleichung berechneten 8,2 g.

Von dem Dicinnimat

aus l-Weinsäure drehten 0,3 g in Sodalösung — Vol. 20 ccm — im 1-dcm-Rohr

$$\alpha = +1{,}50^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = +100{,}0^0;$$

aus d-Weinsäure 0,3 g in Sodalösung — Vol. 20 ccm — im 1-dcm-Rohr

$$\alpha = -1{,}40^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -93{,}3^0\,^1).$$

Danach verhalten sich die beiden Weinsäuren, abgesehen von den unvermeidlichen Versuchsfehlern, bei der Schmelze mit Zimtsäureanhydrid völlig gleich, indem sie gleiche Mengen entgegengesetzt drehender Zimtsäuren und Dicinnamate liefern.

15. Spezifische Drehung der Präparate von Dicinnamat; Abnahme des Drehungswinkels α des in Soda gelösten Dicinnamats proportional der Verdünnung.

Nach den letzten Versuchen darf man annehmen, daß das spezifische Drehungsvermögen des Dicinnamats ca. $[\alpha]_D = \pm 100^0$ beträgt, wenn man es direkt nach der Lösung in einem nicht zu großen Überschuß von verdünnter Sodalösung bestimmt. Wie oben gezeigt, kann die Drehung bei längerem Stehen in der kalten Lösung in Soda um etwa 10^0 zunehmen, die sehr wahrscheinlich auf relative Konfigurationsänderungen im Molekül durch die Soda zurückgeführt werden müssen.

Die sehr oft festgestellten niedrigeren Drehwerte können in einzelnen Fällen auf noch eingeschlossene schwächer drehende Zimtsäure, in anderen Fällen dürften sie aber gleichfalls auf relative Konfigurationsschwankungen im Molekül, die noch näher zu erforschen sind, zurückführbar sein.

Von besonderer Wichtigkeit aber ist es, daß der Drehungswinkel α proportional der Verdünnung abnimmt, wie die beiden folgenden mit dem bei der ersten Anhydridschmelze erhaltenen Dicinnamat von dem $[\alpha]_D = -102^0$ zeigen.

---

[1]) Dieses bisher beschriebene, durch lang andauerndes Schmelzen erhaltene amorphe Dicinnamat ist offenbar als Derivat der bei der Schmelze gebildeten, gleichfalls amorphen Metaweinsäure anzusprechen, während es neuerdings gelang, unter anderen Reaktionsbedingungen auch das der krystallisierten Weinsäure entsprechende Dicinnamat in krystallisierter Form vom Z.-P. 166° und von höherem Drehungsvermögen darzustellen, dessen Beschreibung bald folgen wird.

Versuch 1.

0,2 g des genannten Dicinnamats in Soda gelöst — Vol. 20 ccm —, $c = 1$, drehte 20 Stunden nach der Herstellung im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -2{,}24^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -112^0.$$

Die zehnfach verdünnte Lösung, $c = 0{,}1$, drehte im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}23^0.$$

Diese Lösung nochmals um das Zehnfache verdünnt, $c = 0{,}01$, drehte im 2 dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}01 \text{ bis } 0{,}02^0.$$

Versuch 2.

0,3 g des gleichen Präparates in Sodalösung — Vol. 30 ccm —, $c = 1$, drehten im 2-dcm-Rohr gleich nach der Herstellung

$$\alpha = -1{,}94^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -97^0.$$

Zehnfach verdünnt, $c = 0{,}1$, im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}19^0.$$

Nochmals um das Zehnfache verdünnt, $c = 0{,}01$, im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}01 \text{ bis } 0{,}02^0.$$

Eine $0{,}01\,^0/_0$ige Lösung ist also praktisch inaktiv.

16. Beweis für die Abhängigkeit der festgestellten optischen Aktivität bei den untersuchten Zimtsäurepräparaten von der molekularen Asymmetrie der Zimtsäuremoleküle auf Grund von Analyse und Drehungsvermögen.

Die mitgeteilten Untersuchungen haben ergeben, daß bei der Zimtsäureanhydrid-Weinsäureschmelze außer der aktiven Zimtsäure und dem nach der gleichen Richtung drehenden Dicinnamat andere Körper nicht gebildet werden.

Im Hinblick auf das immerhin hohe Drehungsvermögen des neben Zimtsäure gebildeten Dicinnamats von $[\alpha]_D = \pm 100^0$ könnte jemand versucht sein, einzuwerfen, die Aktivität der neben Dicinnamat gebildeten Zimtsäure sei keine neu erworbene Eigenschaft des Zimtsäuremoleküls, sondern verdanke diese, trotz der genau stimmenden Zimtsäureanalysen und trotz der festgestellten Unlöslichkeit des Dicinnamats in Ligroin, der

Beimengung einer geringen Menge des stark drehenden Dicinnamats.

Es ist daher von der größten Wichtigkeit, daß sich auf Grund von Analyse und Drehungsvermögen mit mathematischer Sicherheit beweisen läßt, daß ein solcher Einwurf gar nicht in Betracht kommen kann.

Unter Benutzung des experimentell aufgefundenen Drehungswinkels α bei den aktiven Zimtsäuren hat man zuerst zu berechnen, wieviel Prozent Dicinnamat die aktiven Zimtsäurepräparate enthalten müßten, wenn der abgelesene Drehungswinkel durch beigemengtes Dicinnamat verursacht würde.

Diese Berechnung setzt voraus, daß, wie im letzten Kapitel gezeigt wurde, der Drehungswinkel des Dicinnamats in verdünnter Sodalösung proportional der Verdünnung abnimmt.

In der für das Drehungsvermögen des Dicinnamats gültigen Gleichung

$$[\alpha]_D = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot x} = 100^0$$

hat man für α die jeweils bei den aktiven Zimtsäuren abgelesenen Winkel α und für l die Rohrlänge einzusetzen und dann x die Konzentration von Dicinnamat, die zu dem jeweils abgelesenen Winkel α führen müßte, zu berechnen.

Die Berechnung ergibt:

$$x = \frac{100}{100} \cdot \frac{\alpha}{l} = \frac{\alpha}{l}.$$

$\frac{\alpha}{l}$ stellt also die Menge Dicinnamat in 100 ccm Lösung vor, die bei der Rohrlänge l zum Winkel α führt.

Diese $\frac{\alpha}{l}$ g Dicinnamat müßten enthalten sein in den jeweils bei den Zimtsäurerotationen angewandten Konzentrationen c.

Der Prozentgehalt der angewandten festen Zimtsäure an Dicinnamat berechnet sich dann wie folgt: Von c g Zimtsäure müßten $\frac{\alpha}{l}$ g aus Dicinnamat bestehen, von 100 g daher $p = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$, d. i. der Prozentgehalt der Zimtsäure an Dicinnamat, wenn letzteres die Ursache der Aktivität sein soll.

Da aber der jeweils gefundene Drehwert der untersuchten Zimtsäurepräparate nach der Gleichung $[\alpha]_D = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$ berechnet wird und die Größen α, l, c identisch sind mit den gleichnamigen Größen in der obigen Gleichung $p = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$, so folgt daraus, daß $p = [\alpha]_D$ ist, d. h. der Prozentgehalt der untersuchten Zimtsäurepräparate an Dicinnamat müßte zahlenmäßig gleich sein dem jeweils für die Zimtsäure festgestellten Drehungsvermögen, wenn die Aktivität nicht von den Molekülen der Zimtsäure, sondern von beigemengtem Dicinnamat herrührte. D. h. die Zimtsäure von dem $[\alpha_D] = -20^0$ müßte $20\,\%$, die von $[\alpha]_D = -13{,}4^0$ $13{,}4\,\%$ usw. Dicinnamat enthalten, wenn die Zimtsäure nicht als solche aktiv wäre.

Es braucht nicht darauf hingewiesen zu werden, daß ein so hoher Prozentgehalt der Zimtsäure an Dicinnamat durch die beiden oben angegebenen, äußerst scharfen qualitativen Reaktionen auf Dicinnamat sofort entdeckt würde, wohl aber soll gezeigt werden, daß solche Quantitäten an Dicinnamat auch bei der Elementaranalyse bemerkt werden müßten.

Wie schon oben gezeigt, bewirkt $1\,\%$ Dicinnamat in Zimtsäure $0{,}72 - 0{,}64 = 0{,}08\,\%$ zu wenig Kohlenstoff, kann also bei der Verbrennung, die statt $72{,}97\,\%$ $72{,}89\,\%$ liefern müßte, nicht bemerkt werden. Dagegen müssen 10 bis $20\,\%$ Dicinnamat sich durch einen Fehlbetrag von 0,8 bzw. $1{,}6\,\%$ im Kohlenstoff geltend machen. Da nun die meisten Analysen, auch die der höchstdrehenden Zimtsäurepräparate, bis auf die erste Dezimale im Kohlenstoff, genau stimmende Werte geliefert haben, so ist somit auch durch die Verbrennung der Beweis erbracht, daß bei diesen Präparaten die Aktivität von den Zimtsäuremolekülen selbst verursacht wird und daß somit Zimtsäuremoleküle als solche molekulare Asymmetrie verbunden mit optischer Aktivität annehmen können.

Weiterhin ist es aber von größtem Interesse, daß man mit Hilfe der jeweils gefundenen Kohlenstoffwerte und der jeweils zur Bestimmung der $[\alpha]_D$ verwendeten Zimtsäuremengen in Gramm den Winkel α berechnen kann, den der der Analyse nach noch denkbare Prozentgehalt an Dicinnamat zur Folge haben

müßte, und mit dem wirklich gefundenen Winkel α vergleichen kann.

So wurde z. B. ein Zimtsäurepräparat beschrieben, von dem 0,5 g in 20 ccm Soda gelöst, $c = 2{,}5$, $-0{,}67^0$ im 2-dcm-Rohr drehte entsprechend $[\alpha]_D = -13{,}4^0$ und das bei der Analyse 72,92 statt 72,97% Kohlenstoff lieferte. Die Differenz vom theoretischen Wert beträgt $72{,}97 - 72{,}92 = 0{,}05\%$. Da 1% Dicinnamat einen Fehler von 0,08% Kohlenstoff zur Folge hat, so könnte nach der Analyse in dem Präparat rund nur 0,5% Dicinnamat enthalten sein, was einem Fehlbetrag von 0,04% C entsprechen würde.

Wenn nun die Substanz 0,5% Dicinnamat enthielte, so würden in den zur Polarisation angewandten 0,5 g nur

$$x = \frac{0{,}5 \cdot 0{,}5}{100} = 0{,}0025 \text{ g}$$

Dicinnamat enthalten sein.

Diese 0,0025 g, in 20 ccm Soda gelöst, entsprechen einer Konzentration für eventuell vorhandenes Dicinnamat:

$$c = \frac{0{,}0025 \cdot 100}{20} = 0{,}0125.$$

Für diese Konzentration von rund 0,01% Dicinnamat berechnet sich der Winkel α nach der Gleichung:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \cdot \alpha}{2 \cdot 0{,}01} = 100^0,$$

daher

$$\alpha = \frac{100}{100} \cdot 2 \cdot 0{,}01 = 0{,}02^0$$

übereinstimmend mit dem für die Konzentration 0,01 bei Dicinnamat im letzten Kapitel beobachteten Winkel $\alpha = -0{,}01^0$ bis $-0{,}02^0$.

Von dem bei diesem Zimtsäurepräparat beobachteten Winkel $\alpha = -0{,}67^0$ könnte daher nur ein Winkel $\alpha = -0{,}02$ auf Rechnung beigemengten Dicinnamats kommen, ein Betrag, der innerhalb der Ablesungsfehler liegt.

Bei der $[\alpha]_D = -20^0$ drehenden Zimtsäure würde der nach der Analyse mögliche Betrag an Dicinnamat unter den beim Versuche angewandten Bedingungen den Drehungswinkel $\alpha = -0{,}003$ verursachen, während $0{,}12^0$ gefunden würde.

Bei dem $[\alpha]_D = +5{,}2$ drehenden Präparat könnte der gleichen Berechnung nach ein Winkel $\alpha = +0{,}02^0$ auf Dicinnamat kommen, während $\alpha = +0{,}26^0$ abgelesen wurde, usw.

Auch bei den anderen analysierten aktiven Zimtsäurepräparaten lagen die für die der Analyse noch denkbare Menge beigemengten Dicinnamats berechneten Drehungswinkel durchweg innerhalb oder sehr nahe der Grenze der Ablesungsfehler und stellen somit einen für die wirklich abgelesenen Winkel nicht in Betracht kommenden Betrag vor.

Da, wie früher gefunden, bei der Extraktion der Gemische aktiver Zimtsäure und Dicinnamat mit Wasser, besonders wenn das Dicinnamat geschmolzen ist, geringe Anteile desselben mit durchs Filter gehen, so war es auch nicht ausgeschlossen, daß trotz der Unlöslichkeit des Dicinnamats in Ligroin bei der Extraktion der Zimtsäureanhydrid-Weinsäureschmelze mit Ligroin geringe Mengen Dicinnamat in fein suspendierter Form oder kolloidal gelöst mit durchs Filter gehen könnten.

Deshalb wurden 9,3 g auf diese Weise gewonnene Zimtsäure, die aus Präparaten verschiedener Darstellung und Drehung bestanden, nochmals in heißem Ligroin gelöst. Dabei blieben 0,0315 g Substanz von den typischen Eigenschaften des Dicinnamats ungelöst, also ca. $0{,}3\,\%$, eine Menge, die die Analyse nicht beeinflußt.

Die Lösung dieser 0,0315 g in Soda — Vol. 20 ccm — drehte im 1-dcm-Rohr, $c = 0{,}1575$,

$$\alpha = -0{,}14^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -88{,}9^0.$$

Von einem aktiven Zimtsäurepräparat von dem Dicinnamatgehalt von $0{,}3\,\%$ enthalten 0,5 g, d. i. die gewöhnlich für die Drehung verwendete Menge, nur 0,0015 g. Diese Menge, wie gewöhnlich in 20 ccm Soda gelöst, führt zu einer Konzentration für Dicinnamat von $c = 0{,}0075$. Da aber, wie gezeigt, bei einer Konzentration des Dicinnamats von 0,01 bereits keine Aktivität mehr beobachtet wird, so kommt ein derartig kleiner Gehalt an Dicinnamat bei Feststellung der Aktivität der Zimtsäure praktisch gar nicht mehr in Frage. Immerhin empfiehlt es sich, die durch Ligroinextraktion von Dicinnamat getrennten aktiven Zimtsäuren nochmals aus heißem Ligroin zu krystallisieren, da es wahrscheinlich ist, daß ein Betrag von $0{,}3\,\%$ Dicinnamat, der weder Einfluß auf die Analyse noch auf das

Drehungsvermögen hat, auch bei der Sublimationsmethode der Beobachtung entgeht. Denn wenn 100 Teile aktiver Zimtsäure 0,3 g Dicinnamat enthalten, so berechnen sich auf die zur Sublimationsmethode verwendeten 0,01 g nur 0,00003 g Dicinnamat, eine kaum wägbare Menge, deren Erkennung auch bei der Sublimation als zweifelhaft gelten muß.

Durch die voranstehenden Berechnungen ist nicht nur der einwandfreie Beweis für die Existenz aktiver Zimtsäuremoleküle geliefert, sondern auch die äußerste Grenze der Genauigkeit unserer üblichen Methoden erkannt und bei den Versuchen praktisch erreicht.

17. Krystallform der aktiven Zimtsäure.

Sowohl bei der Schmelze von Zimtsäure mit den Weinsäuren als bei der Schmelze von Zimtsäureanhydrid mit den Weinsäuren findet außer der Aktivierung der Zimtsäure der Übergang der ursprünglich vorhandenen α-Modifikation in die β-Modifikation statt. Der Übergang der α- in die β-Modifikation läßt sich, wie früher gezeigt, auch durch längeres Erhitzen der Storax-α-zimtsäure in Lösungsmitteln, wie z. B. 75% Alkohol oder Ligroin, bewerkstelligen.

Die auf letzterem Weg gewonnene β-Zimtsäure ist aber stets inaktiv und verwandelt sich beim Stehen mit dem Lösungsmittel meist sehr rasch in die α-Modifikation zurück.

Zum Unterschied von der inaktiven β-Zimtsäure erweist sich die aktive Zimtsäure in ihrer β-Form sehr wenig geneigt, in die α-Form zurückzugehen.

Sie läßt sich sogar aus absolutem Alkohol unverändert umkrystallisieren, während die inaktive β-Form aus diesem Lösungsmittel stets in der α-Form krystallisierte.

Da sich aber die β-Zimtsäure aus keinem Lösungsmittel bisher mit Sicherheit in meßbaren Krystallen erhalten ließ, so war es von Wichtigkeit, einen Weg zu finden, auf dem es gelingt, den Übergang der aktiven β-Zimtsäure in ihre α-Form zu bewerkstelligen.

Wenn bisher auch noch kein jederzeit zum Ziele führender Weg aufgefunden worden ist und deshalb nach dieser Richtung noch ausgedehnte Versuche angestellt werden müssen, so wurde doch bisher in drei Fällen beim längeren Stehen

ausgeschiedener aktiver β-Zimtsäure in Ligroinlösung ein spontaner Übergang der aktiven β-Form in die α-Form beobachtet. Bei einem Versuche wurde eine geringe Menge aktiver Zimtsäure, deren $[\alpha]_D = -27^0$ bestimmt worden war, aus heißem Ligroin krystallisiert. Beim Erkalten hatte sich einheitliche β-Zimtsäure abgeschieden. Beim Stehen über Nacht war das Lösungsmittel verdunstet und auf dem Boden des Gefäßes hatten sich neben nur wenigen β-Krystallen zwar kleine, jedoch ausgezeichnet ausgebildete α-Zimtsäurekrystalle ausgeschieden, deren typisch hemiedrische Ausbildung jedem, der nur einmal hemiedrische Krystalle unter Händen gehabt hat, auffallen mußte. Und zwar handelte es sich bei diesen Krystallen nicht nur um das einseitige Auftreten der Fläche *r*, sondern alle Krystalle besaßen noch eine schräg abstumpfende Fläche, die den Krystallen ein völlig asymmetrisches Aussehen verlieh.

Auf die Resultate der Messung wird später zurückgekommen werden.

Auf demselben Weg wurde ein anderes aktives Zimtsäurepräparat in der α-Form erhalten, jedoch in weniger gut gebildeten Krystallen. Es wurde deshalb zur Feststellung des Drehungsvermögens benutzt, das zu $[\alpha]_D = -12^0$ bestimmt wurde. Es ergibt sich daraus, daß die Zimtsäure in ihrer α-Form in hemiedrischen Krystallen verbunden mit Drehungsvermögen existieren kann[1]).

18. Bromaddition an aktive Zimtsäure und aktives Dicinnamat.

Bei der Addition von Brom an das früher durch Auslesen der Krystalle von Storaxzimtsäure erhaltene Präparat, das eine Drehung von einem halben Grad aufwies, war völlig inaktives Dibromid erhalten worden.

Neuerdings wurden noch zwei weitere Versuche mit aktiven Zimtsäurepräparaten angestellt. 0,5 g Zimtsäure von dem $[\alpha]_D = -27^0$ wurden in Chloroform gelöst und dazu die berechnete Menge Brom 0,54 g, in Chloroform gelöst, gegeben.

Die Entfärbung findet im Vergleich zu gewöhnlicher Zimtsäure auffallend langsam statt.

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **35**, 157.

Das nach 48stündigem Stehen ausgeschiedene Dibromid war inaktiv, ebenso das beim völligen Eindampfen der Lösung erhaltene Dibromid.

2 g Zimtsäure von dem $[\alpha]_D = -9^0$ und 2,16 g Brom wurden in Chloroformlösung vereinigt. Das ausgeschiedene Dibromid drehte in 2,5% Lösung im 2-dcm-Rohr 0,00, desgleichen war auch der Eindampfrückstand der Chloroformlösung inaktiv.

Danach muß man annehmen, daß die freie aktive Zimtsäure vor der so auffallend langsam verlaufenden Bromaddition durch die Wirkung des Broms inaktiviert wird.

Da jedoch früher bei der Addition von Brom an das gemischte Zinksalz von d- bzw. l-Phenylmilchsäure und Zimtsäure l- bzw. d-Zimtsäuredibromid erhalten worden war, wurde bisher noch ein Versuch angestellt, Brom an das l-Dicinnamat zu addieren.

2 g l-Dicinnamat wurden in Eisessig gelöst, mit 1,6 g Brom in Eisessig gelöst, zusammengebracht und 3 Tage stehen gelassen. Auch hier erfolgte die Entfärbung nur sehr langsam. Zur Zersetzung der eventuell noch vorhandenen Weinsäureverbindung wurde mit Wasserdampf destilliert, wobei Essigsäure und Bromstyrol übergingen. Die wässerige Flüssigkeit, die neben der abgespaltenen Weinsäure die gebildete Phenylbrommilchsäure enthalten mußte, wurde ausgeäthert. Die ätherische Lösung hinterließ beim Verdunsten einen dickflüssigen Rückstand, dessen Drehungsvermögen in Äther zu $[\alpha]_D = -16{,}5^0$ bestimmt wurde. Da der Sirup, wie das auch oft bei Präparaten von Phyenylbrommilchsäure beobachtet wird, nicht krystallinisch erhalten werden konnte, so wurde er direkt mit Natronhydrat versetzt, zur Gewinnung des entgegengesetzt drehenden phenoxyacrylsauren Natriums. Die alkalische Lösung drehte $\alpha = +0{,}58^0$.

Sie wurde mit Kohlensäure gesättigt und eingedampft und der Rückstand mit 90% Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung drehte im 1-dcm-Rohr $\alpha = +0{,}10^0$.

Das beim Einengen zuerst abgeschiedene Salz, das die Hauptmenge des schwerer löslichen, inaktiven phenoxyacrylsauren Salzes enthalten mußte, drehte in Wasser 0,1 in 14 ccm H_2O, $c = 0{,}7$, im 2-dcm-Rohr $\alpha = +0{,}08^0$, d. i. $[\alpha]_D = +5^0$.

0,2054 g gaben mit SO_4H_2, abgeraucht, 0,0783 Na_2SO.

Ber. für $C_9H_7O_3Na$:	Gef.:
Na 12,36	12,36.

Die Krystallisationsversuche und die Bromadditionsversuche an aktive Zimtsäure und an aktives Dicinnamat sollen noch weiter verfolgt werden.

Theoretischer Teil.

Von Emil Erlenmeyer.

In meiner 1911 erschienenen Abhandlung[1]): „Über labile, ineinander verwandelbare Isomere der gleichen Struktur" habe ich auf die Notwendigkeit hingewiesen, die zahlreich beobachteten Fälle von isomeren Modifikationen bei organischen Verbindungen, deren Verschiedenheit bisher weder durch die Struktur- noch durch die Stereochemie erklärt werden können und die man deshalb mit Vorliebe als polymorphe oder, da man bei ihnen nur physikalische Unterschiede beobachten konnte, als physikalische Isomere bezeichnet hat, ebenfalls dem bewährten Erklärungsprinzip für isomere Verbindungen entsprechend, auf irgendwelche, allerdings noch nicht erkannte Lageverschiedenheiten der Atome im Molekül zurückzuführen. In meiner kürzlich erschienenen Abhandlung[2]): „Über den Ursprung optisch aktiver Verbindungen in der lebenden Zelle; künstliche Darstellung optisch aktiver Verbindungen, ohne Anwendung asymmetrischer Moleküle oder asymmetrischer Kräfte" habe ich dann betont, daß die Sachverständigen auf diesem Gebiete, der sogenannten polymorphen oder physikalisch isomeren Verbindungen, wie Hauy, O. Lehmann, Arzruni von jeher den gleichen Standpunkt vertreten haben.

Um die Berechtigung der von mir gestellten Forderung an einem bestimmten Beispiel beweisen zu können, wählte ich die von Liebermann und Erlenmeyer sen. entdeckten labilen isomeren Zimtsäuren von den Schmelzpunkten 42°, 58° und 68°, an deren Existenz damals ein Teil der Chemiker zu zweifeln schien, da ihre erneute Darstellung mehreren namhaften Forschern nicht mehr gelingen wollte.

[1]) Diese Zeitschr. **34**, 306, 1911.
[2]) Diese Zeitschr. **52**, 439, 1913.

In Gemeinschaft mit einigen Schülern gelang es mir, die Isozimtsäure von Erlenmeyer sen. sowohl, als die Isozimtsäure von Liebermann neu zu entdecken, deren Identität mit den früheren Präparaten von Erlenmeyer sen. bzw. Liebermann durch die krystallographische Untersuchung einwandfrei festgestellt werden konnte.

Die wichtigsten Resultate dieser Untersuchungen habe ich in dem Zeitraum von 1904 bis 1907 in den Berichten der Deutschen chemischen Gesellschaft mitgeteilt[1]).

Die genaueren Befunde waren derart, daß ich nicht entfernt daran zweifeln konnte, daß die drei Säuren nicht nur physikalische, sondern auch chemische Isomere vorstellen, die allerdings sehr labil sind und daher leicht ineinander verwandelt werden können.

Im Jahre 1909 hat nun Biilmann[2]) die Hypothese aufgestellt, die drei Säuren seien, da sie durch Schmelzen ineinander verwandelt werden können, trimorph.

Da mir diese Ansicht nicht genügend experimentell gestützt erschien, habe ich sogleich in einer kurzen Abhandlung in den Berichten gegen die Trimorphiehypothese Bedenken geltend gemacht[3]).

Weil aber gleichwohl die Biilmannsche Hypothese bei einem Teile der Fachgenossen Aufnahme zu finden schien, so hielt ich es für nötig, in der eingangs genannten Arbeit die bis 1911 von Erlenmeyer sen., Liebermann und mir mitgeteilten Untersuchungen zu besprechen und zu zeigen, daß sie Beobachtungen enthalten, die sowohl einzeln als in ihrer Gesamtheit einwandfrei beweisen, daß die labilen Zimtsäuren tatsächlich als isomere Körper aufgefaßt werden müssen, deren Verschiedenheit auf eine bisher noch unbekannte, verschiedene gegenseitige Stellung der Atome im Molekül zurückzuführen ist.

In dem gleichen Jahr hat Hantzsch[4]) der Möglichkeit Raum gegeben, daß die drei Säuren isomer sind.

Ganz vor kurzem endlich hat auch Stobbe[5]) meine Auffassung

---

[1]) Vgl. auch diese Zeitschr. **84**, 306 ff., 1911.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**, 182.
[3]) Ebenda **42**, 521, 1909.
[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 2009, 1911.
[5]) Liebigs Annal. **402**, 187, 1913.

von der Isomerie der labilen Zimtsäuren bestätigt, indem er in Übereinstimmung mit meinen Angaben die drei labilen Säuren nach der von Erlenmeyer sen. stammenden Methode aus Petroläther bei vorsichtigem Erwärmen, am besten durch Anwendung der Handwärme, ohne Umlagerung umkrystallisieren konnte, woraus die Verschiedenheit in Lösung oder die Isomerie zu folgern ist.

Bezüglich der anderen auf Grund mühevoller Untersuchungen von Stobbe mitgeteilten Beweismomente sei auf das Original verwiesen.

Mit der Erkenntnis der Existenz von drei labilen, isomeren Zimtsäuren, zu denen noch die trikline Zimtsäure und ferner die gleichfalls isomeren Storax-α und -β-zimtsäure kommen — während die von mir eingehend studierten Hetero-α- und -β-zimtsäure ihre von der Storax-α- und -β-zimtsäure abweichenden Eigenschaften, wie in Gemeinschaft mit Hilgendorff und Marx bewiesen wurde[1]), auf isomere Zustände des Benzolkerns zurückgeführt werden müssen — ist der Beweis erbracht, daß die bisher geltende geometrische Auffassung der Äthylenderivate unzutreffend ist, da diese niemals mehr als zwei isomere Zimtsäuren zuläßt.

Wenn aber die geometrische Auffassung, nach der unweigerlich die vier am Äthylenkern befindlichen Radikale und die beiden Kohlenstoffe in einer Ebene liegend gedacht werden müssen, nicht zu Recht besteht, so bleibt gar kein anderer Ausweg übrig, als auch bei den Äthylenderivaten eine räumliche Verteilung der Gruppen zuzugestehen.

Meine zuerst gehegte Vermutung, daß zwischen den beiden geometrischen Isomeren eine labile räumliche Zwischenlage in einer Rechts- und einer Linksform existieren könne, habe ich selbst durch das Experiment widerlegt[2]).

Nach Ausschließung dieser Möglichkeit mußte man die geometrischen Formeln überhaupt fallen lassen und alle isomeren Zimtsäuren, mit Ausnahme der Heterozimtsäuren, auf verschiedene räumliche Lagerungen der Atome im Molekül zurückführen, die dann natürlich auch molekulare Asymmetrie bei den Äthylenderivaten zur Folge haben mußte.

[1]) Diese Zeitschr. **34**, 355 ff., 1911.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 453, 1907.

Zum Nachweis der Richtigkeit dieser Schlußfolgerung mußte versucht werden, bei der Zimtsäure die von Pasteur aufgestellten Merkmale für die molekulare Asymmetrie: Hemiedrie und optisches Drehungsvermögen aufzufinden.

Da diese Merkmale bisher bei keiner ungesättigten Verbindung nachgewiesen werden konnten, so war damit zu rechnen, daß diese Merkmale bei ungesättigten Verbindungen von sehr vorübergehender Natur, durch Racemisierung leicht verschwinden können.

In der Abhandlung[1]): „Zur Frage nach der Existenzfähigkeit molekular asymmetrischer Storaxzimtsäuren" habe ich alle sowohl früher als neuerdings gemachten Beobachtungen zusammengestellt, die, wenn sie auch noch nicht als vollgültiger Beweis für die Existenz molekular asymmetrischer Zimtsäuren anzusehen waren, diese jedoch im höchsten Grade wahrscheinlich machen.

In meiner Abhandlung[2]): „Theoretische Betrachtungen über die Isomerie bei Äthylenderivaten" habe ich dann in engster Anlehnung an die van't Hoffschen Anschauungen eine Theorie aufgestellt, die in ungezwungener Weise die Existenzmöglichkeit von je sechs raumisomeren Äthylenderivaten des Typus der Zimtsäure voraussehen läßt.

Der erste Teil dieser Theorie setzt voraus, daß entgegen der von van't Hoff für diesen Fall aufgestellten Spezialhypothese Verbindungen mit zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen oder Verbindungen von dem Typus der Äpfelsäure unter geeigneten Bedingungen in den bisher wenig bekannten Konfigurationen beständig sein können, die sich durch Drehung um die C—C-Achse auseinander ableiten lassen und führte als Beleg einzelne in der Literatur niedergelegte Beispiele an.

Diesen ersten Teil der Theorie führte ich in der bereits zitierten Abhandlung: „Über den Ursprung optisch aktiver Verbindungen in der lebenden Zelle usw." weiter aus und bezeichnete diese durch Drehung um die C—C-Achse auseinander hervorgehenden α-, β-, γ-Modifikationen zum Unterschied von den Isomeren, bei denen die verschiedenen Stellungen der Atome auf verschiedene Bindung zurückzuführen sind und die

[1]) Diese Zeitschr. **35**, 134, 1911.

[2]) Ebenda **35**, 149, 1911.

ich unter dem Namen Bindungsisomere zusammenfaßte, als relative Isomere, da bei ihrer Ableitung die verschiedenen relativen Stellungen der Atome im Molekül ohne Änderung der Bindungen zustande kommen, lediglich durch Drehung um die *C*—*C*-Achse.

Ich wies darauf hin, daß die Veränderlichkeit im Drehungsvermögen bei der Äpfelsäure und bei anderen aktiven Verbindungen durch Konzentrationswechsel oder beim Erwärmen, auf solche relative Konfigurationsänderungen, infolge von Drehung um die *C*—*C*-Achse zurückzuführen sind. Auch die vielfach beobachteten Fälle von Multirotation, bei denen sich teilweise solche α-, β- und γ-Modifikationen abscheiden ließen, lassen sich ganz ungezwungen auf relative Isomerie zurückführen.

Als wichtigste Folgerung aus meiner Theorie von der relativen Isomerie bei Körpern mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen ergab sich mir die Möglichkeit einer völlig neuen Trennungsmethode von d,l-Verbindungen ohne Anwendung asymmetrischer Kräfte oder Moleküle, die sich bereits in zwei Fällen durch das Experiment beweisen ließ und deren Durchführbarkeit eine befriedigende Erklärung lieferte für die primäre Entstehung optisch aktiver Verbindungen in der lebenden Zelle.

Durch das Gelingen dieser Versuche, sowie durch den Nachweis der vorübergehenden Veränderlichkeit in der Löslichkeit des Asparagins bei 20° nach nur kurzem Erhitzen seiner wässerigen Lösung und darauffolgender Abkühlung, hat die Theorie der relativen Isomerie bei den Verbindungen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen eine weitere wichtige Stütze erhalten.

Über die Fortsetzung dieser Versuche wird demnächst berichtet werden.

Der zweite Teil der Theorie behandelt die relative Isomerie bei ungesättigten Verbindungen in Sonderheit bei Äthylenderivaten.

Mit der Widerlegung der geometrischen Betrachtungsweise bei Äthylenderivaten durch den Nachweis der Existenz von mehr als zwei isomeren Zimtsäuren konnte auch die Lehre von der doppelten Kohlenstoffbindung und anderer doppelt oder mehrfach gebundener Atome nicht mehr aufrechterhalten

bleiben, und es war notwendig, zu der früheren Vorstellung von unbesetzten Affinitätsstellen bei ungesättigten Gruppen zurückzukehren.

Während man aber früher z. B. bei der Zimtsäure die folgende Formel:

$$C_6H_5—CH_2—\dot{C}—COOH$$

für möglich, ja sogar für wahrscheinlich hielt, hat Erlenmeyer sen. den Beweis geliefert, daß bei der Zimtsäure und allen Äthylenderivaten die unbesetzten Affinitäten stets nur an zwei benachbarten Kohlenstoffatomen auftretend gedacht werden müssen.

Das Wesentliche bei der neuen Ansicht über Äthylenderivate besteht daher in dem Auftreten der zwei Lücken an zwei benachbarten Kohlenstoffatomen.

In der Formel läßt sich dies am besten zum Ausdruck bringen, indem man die an den benachbarten C-Atomen gebildeten Lücken mit dem Buchstaben L bezeichnet.

Für die Zimtsäure ergibt sich dann die Formel:

$$C_6H_5—CHL—CHL—COOH.$$

Mit Hilfe dieser Lückenformeln lassen sich alle ungesättigten Verbindungen direkt mit den Körpern mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen in Vergleich bringen, da sich die Formeln der letzteren aus den ersteren ergeben, wenn man die Lücken L durch zwei vom Wasserstoff verschiedene Atome oder Radikale besetzt denkt. Oder man kann z. B. die Zimtsäure in der Lückenformel aus zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen bestehend denken, an denen die Lücken, d. h. die unbesetzten Tetraederecken, jeweils die Rolle des vierten verschiedenen Atoms spielen.

Zur räumlichen Darstellung der nach der Theorie denkbaren stereoisomeren Äthylenderivate eignen sich am besten die in meiner Abhandlung[1]) S. 155 ff. wiedergegebenen Modelle.

Die dort in Fig. 6 und 7 mitgeteilten Zimtsäuremodelle lassen ohne Schwierigkeit das Verhältnis der neuen räumlichen Formeln zu den bisherigen geometrischen erkennen, und die durch Fig. 8 bis 13 ausgedrückten Modelle geben einen Überblick über die durch Drehung um die *C*—*C*-Achse auseinander

[1]) Diese Zeitschr. **35**, 149 ff., 1911.

ableitbaren relativ isomeren Modifikationen, die, wie die Modelle Fig. 14 bis 25 zeigen, in je 2 spiegelbildlichen Formen auftreten können.

Bemerkenswert sind die S. 155 bis 161 niedergelegten Besprechungen dieser räumlichen Formeln im Hinblick auf die bis dahin bei den Zimmtsäuren bekannt gewordenen Tatsachen.

Unter diesen verdienen besonders die Anzahl der bisher aufgefundenen Zimtsäuren, als auch die bei der Storax-α-zimtsäure, der Allozimtsäure und der Isozimtsäure 58° beobachteten hemiedrischen Krystalle als Stütze für die neue Betrachtungsweise Beachtung.

Nach allen auf diesem schwierigen Gebiete gemachten Erfahrungen war ich fest davon überzeugt, daß die bei den genannten Zimtsäuren beobachtete Hemiedrie keine zufällige Wachstumserscheinung sei, sondern als Folge leicht veränderlicher, molekularer Asymmetrie aufgefaßt werden müsse.

Um so mehr mußte ich daher darauf bedacht sein, auch das zweite Merkmal für molekulare Asymmetrie: das optische Drehungsvermögen bei den Zimtsäuren einwandfrei festzustellen.

Die erste Idee, wie man dieses Ziel erreichen könnte, hatte sich mir bereits bei der Bearbeitung der aus Allozimtsäure entstehenden Brucinsalze aufgedrängt.

Die vor 10 Jahren[1]) festgestellte Tatsache, daß bei der Darstellung des Brucinsalzes der Allozimtsäure diese Säure verschwindet unter Bildung von zwei in Löslichkeit, Krystallisationsfähigkeit, Schmelzpunkt und Drehungsvermögen verschiedenen isomeren Salzen der Formel $C_9H_8O_2$, $C_{23}H_{26}N_2O_4$, von denen das höher schmelzende, gut krystallisierte Salz die Liebermannsche Isozimtsäure 59° in hemiedrischen Krystallen, das amorphe dagegen die nämliche Säure, aber in holoedrischen Krystallen lieferte, führte mich, nachdem ich die zuerst aufgestellte, damals wahrscheinliche Hypothese, die Allozimtsäure zerfiele bei der Brucinsalzbildung, der Trennung von Racemsäuren analog, in zwei spiegelbildliche Isozimtsäure vom Schmelzpunkt 59°, durch das Experiment widerlegt hatte, zu der noch allein möglichen Vorstellung, daß es sich bei der Brucinsalzbildung um eine Umwandlung der Allozimtsäure handeln müsse, ver-

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **34**, 300ff., 1911.

ursacht durch eine spezifisch asymmetrische Wirkung des Brucins.

Bei Anwendung des entgegengesetzt drehenden Brucins, das leider nicht zur Verfügung stand, hätte man dann, so dachte ich mir, die Bildung der entgegengesetzt hemiedrischen Isozimtsäure (L) neben holoedrischer Isozimtsäure (L) beobachten müssen.

Diese Vorstellung einer von asymmetischen Molekülen ausgehenden Kraft, die richtend auf andere, insbesondere auf ungesättigte Verbindungen einwirken kann, habe ich dann auf Grund der bei der Reduktion von aktiver Phenylbrommilchsäure mit Zink und Alkohol erhaltenen experimentellen Resultate in der Abhandlung: „Über induzierte molekulare Asymmetrie bei ungesättigten Verbindungen" weiter entwickelt[1]).

Es gelang nämlich, durch Zusammenbringen von aktiver d- bzw. l-Phenylmilchsäure mit inaktiver Zimtsäure mit ZnO und $ZnBr_2$ in alkoholischer Lösung und darauffolgendes Erwärmen die bei der Reduktion aktiver Phenylbrommilchsäure mit Zink und Alkohol entstehende Flüssigkeit mit dem hohen Drehungsvermögen künstlich herzustellen.

Ich wies darauf hin, daß deren außerordentlich hohe Aktivität nicht befriedigend durch die Aktivität der in Lösung befindlichen aktiven Phenylmilchsäure erklärt werden könne, daß man vielmehr annehmen müsse, daß die ursprünglich inaktive Zimtsäure durch die induzierende Wirkung der aktiven Phenylmilchsäure teilweise in eine molekular asymmetrische Form übergeführt worden sei, die die Ursache des beobachteten ungewöhnlich hohen Drehungsvermögens der Lösung des kombinierten Zinksalzes vorstellt.

Daß bei der künstlichen Herstellung dieser Lösungen die Zufuhr von Wärme, also von Energie, einen Einfluß auf die Höhe der erworbenen Drehung ausüben kann, habe ich schon damals in Betracht gezogen.

Bei der Aufarbeitung dieser Lösungen auf Zimtsäure wurde stets aktive Zimtsäure erhalten. Bei der großen Schwierigkeit der Trennung der aktiven Phenylmilchsäure aber von der aktiven Zimtsäure erhielten wir nur bei wenigen Operationen

[1]) Diese Zeitschr. **43**, 445, 1912.

schwach aktive Zimtsäure, von denen wir überzeugt sein konnten, daß sie keine aktive Phenylmilchsäure mehr enthielten.

Es war danach keine Aussicht vorhanden, auf diese Reaktion ein leicht ausführbares Verfahren zur Gewinnung von aktiver Zimtsäure zu begründen und dadurch den einwandfreien Beweis dafür zu liefern, daß die Zimtsäure in molekular asymmetrischer, optisch aktiver Form existieren kann.

Deshalb mußte es als großer Fortschritt begrüßt werden, als es gelang, durch Bromaddition an das durch Eindampfen gewonnene gemischte Zinksalz von aktiver Phenylmilchsäure und Zimtsäure in Chloroformlösung ein Gemisch von aktiver Phenylmilchsäure und Zimtsäuredibromid zu gewinnen, das sich durch Wasser in der Kälte trennen ließ in d-Phenylmilchsäure und l-Zimtsäuredibromid bzw. in l-Phenylmilchsäure und d-Dibromid.

Denn die Gewinnung entgegengesetzt drehender Zimtsäuredibromide mit Hilfe der aktiven Phenylmilchsäure liefert den Beweis, daß die Zimtsäure in dem gemischten Zinksalz von Zimtsäure und aktiver Phenylmilchsäure zum Teil in einer der angewandten aktiven Phenylmilchsäure entgegengesetzt molekular asymmetrischen Form enthalten ist, deren molekulare Asymmetrie bei der Bromaddition in Form von entgegengesetzt aktivem Dibromid festgelegt wird[1]).

Der durch diese Versuche bewiesene Übergang der sonst inaktiven Zimtsäure in eine mit optischer Aktivität verbundene molekular asymmetrische Form läßt sich nur durch eine von der aktiven Phenylmilchsäure unter den gegebenen Bedingungen ausgehende, die einseitige molekulare Asymmetrie induzierende Kraft erklären.

Wie in meiner Theorie gezeigt wurde, muß die rechts asymmetrische Zimtsäure in ihrer α-Form vermöge der unbesetzten Affinitäten, vgl. S. 160, Fig. 26 und 27, sehr leicht in die links asymmetrische Zimtsäure und umgekehrt überführbar

[1]) Irrtümlich war früher auf Grund eines einzigen Versuchs angegeben worden, daß aus l-Dibromid bei der Zersetzung mit Wasser d-Phenylbrommilchsäure entsteht. Eine Reihe neuerer Versuche hat ergeben, daß die aus aktivem Dibromid entstehende Phenylbrommilchsäure in derselben Richtung dreht, wie das angewandte Dibromid.

sein. Bei der Einwirkung der aktiven Phenylmilchsäure auf das labile ungesättigte d, l-Molekül der Zimtsäure sucht die von dem aktiven Molekül ausgehende richtende Kraft die Moleküle der Zimtsäure in eine dem aktiven Molekül entsprechende einseitig asymmetrische Lage zu bringen und schafft dadurch einen Überschuß der einen aktiven Form der Zimtsäure.

Findet dann noch durch Energiezufuhr in Form von Wärme eine Drehung um die $C—C$-Achse statt, so daß die α-Form in die energiereichere β-Form übergeht, so läßt sich an der Hand des Modells leicht erkennen, daß in dieser Form die erworbene Aktivität weniger leicht durch Racemisierung verloren gehen kann, wie bei der α-Form, da die freien Affinitäten, die bei dieser Form den Übergang von rechts in links oder umgekehrt erleichtern, sich bei der β-Form in einer für die Umlagerung viel ungünstigeren gegenseitigen Lage befinden.

Um nun die durch die Induktion entstehende aktive Zimtsäure in ihrer β-Form zu stabilisieren, durfte es notwendig sein, die Induktion unter gleichzeitigem Erhitzen vor sich gehen zu lassen.

Wie die zahlreichen Versuche in der voranstehenden Untersuchung lehren, läßt sich dieses Ziel tatsächlich erreichen, wenn man Zimtsäure und Weinsäure längere Zeit bei 168 bis 170° schmilzt.

Hierbei findet nicht nur eine teilweise, der angewandten Weinsäure entgegengesetzte Aktivierung der freien Zimtsäure unter gleichzeitigem Übergang in die β-Form statt; man hat vielmehr anzunehmen, daß auch der Teil der mit Weinsäure verschmolzenen Zimtsäure, der unter Bildung von Mono- und Dicinnamat in die Weinsäure eintritt, in diesen Verbindungen in einer der Weinsäure entgegengesetzten molekular asymmetrischen Form enthalten ist, da sich die aus ihnen durch vorsichtige Verseifung erhaltenen Zimtsäuren durch ein sehr hohes, der Weinsäure entgegengesetztes Drehungsvermögen auszeichnen.

Zu dem gleichen Schluß zwingt die Gewinnung von rechtsdrehendem phenoxyacrylsaurem Natrium aus dem Bromadditionsprodukt des Links-Dicinnamats.

Von noch größerem Interesse aber ist es, daß auch die bei der Schmelze von inaktivem Zimtsäureanhydrid mit d- bzw. l-Weinsäure unter gleichzeitiger Bildung von l- bzw. d-Dicinnamat frei werdende Zimtsäure, obwohl sie mit der Weinsäure auch nicht vorübergehend in Bindung getreten sein kann, ein sehr beträchtliches Drehungsvermögen von der der angewandten Weinsäure entgegengesetzten Richtung besitzt.

Diese erworbene recht beträchtliche Aktivität der Zimtsäure kann, bei allen beschriebenen Versuchen, nur als die Wirkung einer asymmetrisch wirkenden Kraft aufgefaßt werden, die unter den angewandten Bedingungen von den asymmetrischen Molekülen ausgeht und das in seiner Konfiguration veränderliche Molekül die Zimtsäure zwingt, sich gleichfalls in einer molekular asymmetrischen Form einzustellen.

Wegen der Ähnlichkeit mit anderen Induktionswirkungen bezeichne ich diese von optisch aktiven Molekülen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen ausgehende Kraftwirkung als **asymmetrische Induktion.**

Diese Kraft spielt zweifellos in der lebenden Zelle eine überaus wichtige Rolle.

Beweist doch die Bildung von d-Dibromid aus dem gemischten Zinksalz von l-Phenylmilchsäure und Zimtsäure und die Bildung von d-phenoxyacrylsaurem Natrium aus l-Dicinnamat ohne gleichzeitige Bildung der Antipoden, daß diese Kraft, die die Ursache der sich in der Pflanze abspielenden asymmetrischen Synthesen ist, als **die von Pasteur und van't Hoff vermutete asymmetrische Kraft anzusprechen ist, die jedoch, wie die Untersuchung gelehrt hat, nicht von der lebenden Zelle selbst, sondern von den in ihr enthaltenen asymmetrischen Molekülen ausgeht.**

Nachdem ich vor kurzem gezeigt habe, wie man sich die primäre Bildung der optisch aktiven Körper in der Pflanze vorzustellen hat, so können nunmehr die beiden rätselhaften Probleme: **Primäre Entstehung der optisch aktiven Verbindungen in der Pflanze und asymmetrische Synthese als befriedigend gelöst gelten.**

Mit der Entdeckung der asymmetrischen Induktion ist die Wirkung einer neuen Kraft nachgewiesen worden, deren An-

wendung auch auf rein chemischem Gebiet noch manchen schönen Erfolg erhoffen läßt.

Die Bildung der optisch aktiven Zimtsäure durch asymmetrische Induktion stellt eine prinzipiell neue Methode vor, um. ausgehend von optisch inaktiven ungesättigten Verbindungen, zu der einseitig asymmetrischen Modifikation, ohne gleichzeitige Bildung ihres Spiegelbildes, zu gelangen.

Die optisch aktiven Zimtsäuren selbst stellen die ersten Vertreter einer völlig neuen Kategorie molekular asymmetrischer, optisch aktiver Moleküle vor, die kein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthalten.

Ihre Existenz beweist, daß die Stereochemie von der ursprünglichen und weit allgemeineren Auffassung Pasteurs, daß die optische Aktivität die Folge der molekularen Asymmetrie ist, auszugehen hat.

Zu dem gleichen Schluß zwingen auch die großartigen Resultate A. Werners, der in seiner Abhandlung[1]): Zur Kenntnis des asymmetrischen Co-Atoms nachwies, daß selbst bei Besetzung aller Koordinationsstellen des Zentralatoms durch struktur-identische Gruppen, lediglich durch die molekulare Asymmetrie optische Aktivitat bewirkt wird. Ferner auch die Tatsache, daß die Mesoweinsäure trotz der in ihr enthaltenen zwei asymmetrischen Kohlenstoffatome optisch inaktiv ist, weil eben ihr Molekül als solches eine molekulare Asymmetrie nicht besitzt.

Die optisch aktiven Substanzen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen oder anderen mehrwertigen Zentralatomen stellen dann unter den überhaupt denkbaren molekular asymmetrischen Verbindungen nur eine spezielle Kategorie vor, die allerdings ihrer größeren Beständigkeit wegen leichter gefaßt werden und darum der Beobachtung nicht entgehen konnten.

Wie bereits die Existenz von mehr als zwei isomeren Zimtsäuren, so beweist noch viel mehr die Existenz der optisch aktiven Zimtsäuren die Unhaltbarkeit der Lehre von der geometrischen Isomerie bei Äthylenderivaten und ebenso der Lehre von der doppelten Kohlenstoffbindung.

Alle aufgefundenen Tatsachen lassen sich dagegen mit

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 45, 121, 1912.

Hilfe der von mir nach den Grundvorstellungen Pasteurs erweiterten Le Bel-vant Hoff'schen Theorie ohne Schwierigkeit deuten, und liefern somit für diese eine sehr wichtige Stütze.

Zustammenstellung der nach der erweiterten Theorie denkbaren, molekular asymmetrischen, räumlich isomeren, organischen Verbindungen.

1. Relative Isomerie bei gesättigten Verbindungen mit zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen.

Die für diesen Fall denkbaren, durch Drehung um die *C*—*C*-Achse auseinander ableitbaren, relativ isomeren Modifikationen mit zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen hat bereits van't Hoff in der ersten Auflage seiner Broschüre Seite 5 und 6 zusammengestellt.

Es ergibt sich daraus, daß jede der der van't Hoffschen Theorie nach mögliche, molekular asymmetrische, bindungsisomere Modifikation in drei relativ isomeren Modifikationen denkbar ist, die ich als α-, β-, γ-Modifikationen bezeichnet habe. Die Gesamtanzahl von denkbaren bindungsisomeren und relativ isomeren Modifikationen beträgt also bei zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen

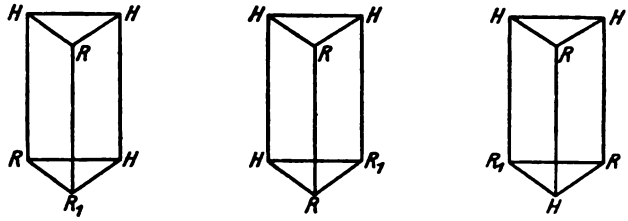
$$N = 2^2 \cdot 3 = 12.$$

Über die Bedingungen, unter denen die der Theorie nach möglichen relativ isomeren Modifikationen sich bilden und bestehen können, muß das Experiment entscheiden.

2. Relative Isomerie bei gesättigten Verbindungen mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom.

Bei gesättigten Verbindungen mit nur einem asymmetrischen Kohlenstoffatom ergibt sich erst dann die Möglichkeit der Existenz relativ isomerer Modifikationen, wenn sich eines der vier am asymmetrischen Kohlenstoff befindlichen verschiedenen Radikale auflösen läßt in die Gruppe $-CH_2-R$.

Der einfachste Typus ist durch die Formel $\begin{matrix} & R_1 \\ CH & \\ & R \end{matrix}—CH_2—R$ ausdrückbar und kann in den durch die folgenden Modelle wiedergegebenen untereinander verschiedenen α-, β-, γ-Modifikationen existierend gedacht werden.



Jeder dieser drei Modifikationen entspricht ein Spiegelbild, so daß für diesen Fall die denkbare Anzahl der bindungsisomeren und relativ isomeren Modifikationen beträgt

$$N = 2^1 \cdot 3 = 6.$$

Zu diesem Typus gehört die Äpfelsäure, von der die α- und β-Modifikation wahrscheinlich nur in Salzen, die γ-Modifikation aber als Crassulaceenäpfelsäure auch als freie Säure existenzfähig ist. Auch das Asparagin und die Asparaginsäure gehören diesem Typus an und alle monosubstituierten Bernsteinsäuren, ferner die Diphenylhydrozimtsäure, bei der gleichfalls bereits isomere Modifikationen beobachtet wurden, und die monosubstituierten Abkömmlinge des asymmetrischen Diphenyläthans usw.

In diesem Typus kann auch statt R R R_1 : R_1 R_2 R_3 stehen, ohne daß dadurch die Anzahl der denkbaren isomeren Modifikationen geändert wird.

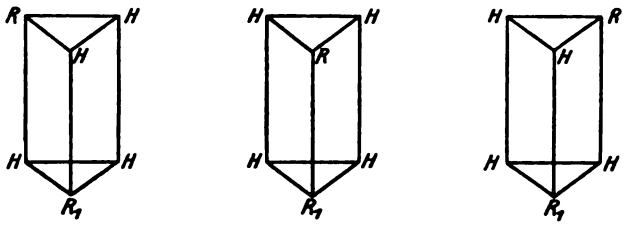
3. Relative Isomerie, verbunden mit molekularer Asymmetrie bei gesättigten Verbindungen ohne asymmetisches Kohlenstoffatom.

Die hierbei in Frage kommenden Verbindungen gehören den fünf Typen an:

1. $\begin{matrix} CH_2—R \\ | \\ CH_2—R \end{matrix}$ 2. $\begin{matrix} CH_2—R \\ | \\ CH_2—R_1 \end{matrix}$ 3. $\begin{matrix} CX_2—R \\ | \\ CX_2—R \end{matrix}$ 4. $\begin{matrix} CX_2—R \\ | \\ CX_2—R_1 \end{matrix}$

5. $\begin{matrix} CX_2—R \\ | \\ CY_2—R \end{matrix}$ 6. $\begin{matrix} CX_2—R \\ | \\ CY_2—R_1. \end{matrix}$

Von Typus 2 leiten sich z. B. die durch die folgenden Modelle darstellbaren relativ isomeren Modifikationen ab:



Wie leicht zu erkennen ist, sind die drei relativ isomeren Modifikationen in diesem Falle nicht mehr alle drei voneinander verschieden. Die durch Modell 2 ausgedrückte Modifikation ist vielmehr molekular symmetrisch, die Symmetrieebene läßt sich durch R und R_1 legen. Die durch Modell 1 und 3 ausgedrückten Modifikationen dagegen sind molekular asymmetrisch und stellen Spiegelbilder zueinander vor.

Von Interesse ist es, daß die drei von diesem Typus sich ableitenden drei relativ isomeren Modifikationen danach dem zweiten von Pasteur gebrauchten Bild von der rechts-, der linksgedrehten und der aufgedrehten Spirale entsprechen. Modell 1 und 3 stellen die rechts- bzw. linksgedrehte, Modell 2 die aufgedrehte Spirale vor.

Von den relativ isomeren Modifikationen dieser letzteren Kategorie ist ein Beispiel bisher nicht bekannt geworden, und es kann daher zweifelhaft sein, ob es möglich sein wird, die hierher gehörigen Isomeren in beständiger Form zu fassen.

Nach den bisherigen Methoden dürfte es wohl schwerlich gelingen, dagegen ist es nicht ausgeschlossen, eine der den Modellen 1 oder 3 entsprechenden Modifikationen durch die asymmetrische Induktion zu gewinnen.

Sehr wahrscheinlich aber wird sich die Existenzmöglichkeit dieser Modifikationen durch Rotationsschwankungen verraten, wenn man sie mit optisch aktiven Substanzen vereinigt. Beobachtungen dieser Art haben wir bereits bei der Darstellung des Brucinsalzes der β-Jodpropionsäure gemacht, worauf später zurückgekommen werden soll.

4. Molekulare Asymmetrie bei Verbindungen mit ungesättigten Gruppen.

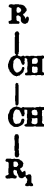
a) Äthylen- und Acetylenderivate.

Durch die voranstehenden Untersuchungen ist der einwandfreie Beweis geliefert, daß auch Körper mit ungesättigten Gruppen, wie die Zimtsäure, durch die asymmetrische Induktion in einseitig molekular-asymmetrische Formen, verbunden mit optischem Drehungsvermögen und Hemiedrie, übergeführt werden können.

Dieser Vorgang ist nur dann verständlich, wenn man annimmt, daß die Kohlenstoffatome des Äthylens gleichfalls durch eine einzige Bindung miteinander verknüpft sind, während die noch disponiblen Affinitäten unbesetzt bleiben und in Form von Lücken an den beiden benachbarten Kohlenstoffatomen vorhanden sind, die man in der Konstitutionsformel mit dem Buchstaben L bezeichnet.

In dieser Weise geschrieben, lassen sich dann die ungesättigten Verbindungen sehr leicht mit den gesättigten Verbindungen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen in Parallele setzen.

Den gesättigten Verbindungen von der allgemeinen Formel:

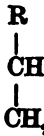


entsprechen dann die ungesättigten Verbindungen der allgemeinen Formel:

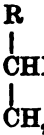
Die Anzahl der denkbaren räumlich isomeren Modifikationen sowohl der bindungsisomeren als der relativ isomeren beträgt in beiden Fällen:

$$N = 2^2 \cdot 3 = 12.$$

Den gesättigten Verbindungen der allgemeinen Formel:



entsprechen die ungesättigten Verbindungen der allgemeinen Formel:



Auf Grund des in ihnen enthaltenen asymmetrischen Kohlenstoffatoms sind

$$N = 2^1 = 2$$

isomere Modifikationen zu erwarten.

Da aber dieser Typus mit dem unter 2 beschriebenen übereinstimmt, so können die beiden bindungsisomeren Modifikationen noch in je 3 relativ isomeren Formen auftreten, wie die Äpfelsäure, also zusammen

$$N = 2^1 \cdot 3 = 6.$$

Das Äthylenbromid entspricht dem Äthylen:

$$\begin{array}{l} CH_2Br \\ | \\ CH_2Br \end{array} \qquad \begin{array}{l} CH_2L \\ | \\ CH_2L \end{array}$$

und beide Körper dem unter 3 gegebenen Typus, der, wie gezeigt, in drei isomeren Modifikationen denkbar ist, von denen eine molekular symmetrisch, die andere dagegen, trotz der Abwesenheit eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms, molekularasymmetrisch und spiegelbildlich auftretend gedacht werden können.

Wenn man weiter in den unter 3 gegebenen Typen 3 und 4

$$\begin{array}{l} CX_2R \\ | \\ CX_2R \end{array} \quad \text{und} \quad \begin{array}{l} CX_2R \\ | \\ CX_2R_1 \end{array}$$

an Stelle der X_2 Lücken setzt, so erhält man:

$$\begin{array}{l} CL_2R \\ | \\ CL_2R \end{array} \quad \text{und} \quad \begin{array}{l} CL_2R \\ | \\ CL_2R_1, \end{array}$$

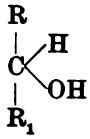
unter welchen beiden Typen das Acetylen und alle Acetylderivate zusammengefaßt werden können, die also unter geeigneten Bedingungen gleichfalls in 3 relativ isomeren Formen, einer symmetrischen und zwei spiegelbildlichen asymmetrischen Formen, existieren könnten.

b) Carbonylverbindungen.

Auf Grund der in der nächsten Abhandlung besprochenen asymmetrischen Synthesen mit Carbonylgruppen enthaltenden Verbindungen muß man auch bei der Carbonylgruppe die Vorstellung der doppelten Bindung fallen lassen und diese Verbindungen ebenfalls durch Lückenformeln ausdrücken.

Statt $\begin{array}{l} R \\ | \\ C{=}O \\ | \\ R_1 \end{array}$ ist zu schreiben $\begin{array}{l} R \\ | \\ C\!\begin{array}{l} \diagup L \\ \diagdown OL. \end{array} \\ | \\ R_1 \end{array}$

In dieser Schreibweise treten die Carbonylverbindungen in Analogie mit den Körpern mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom der Formel:



Sie müssen daher in der gleichen Anzahl von räumlich isomeren Modifikationen existenzfähig gedacht werden wie diese.

In diese Kategorie von Substanzen gehören die Aldehyde, Ketone und Säuren.

Ein schlagender Beweis für die räumliche Isomerie bei Carbonylverbindungen wird in der übernächsten Abhandlung mitgeteilt.

Die Übertragung der hier mitgeteilten Isomeriemöglichkeiten auf ungesättigte Gruppen mit anderen mehrwertigen Elementen, besonders auf solche mit Stickstoff, hat keine Schwierigkeit.

Aus den bisherigen Betrachtungen ergibt sich, daß unter Zugrundelegung des viel umfassenderen Begriffs von der Asymmetrie des Moleküls die Stereochemie einen viel größeren Umfang gewinnt.

Zu den angeführten denkbaren einfachen Fällen von Molekularasymmetrie kommen noch alle durch Kombination von mehreren der der molekularen Asymmetrie fähigen Gruppen ableitbaren Fälle, von deren eingehender Betrachtung heute noch abgesehen wird.

Allen diesen der erweiterten Theorie nach denkbaren räumlich isomeren Verbindungen ist die Fähigkeit gegenseitiger Umwandlung gemeinsam, ohne daß dabei ein Platzwechsel irgendwelcher gebundener Atome oder Radikale anzunehmen wäre, wie dies bei der Umwandlung der bisher allein in Betracht gezogenen isomeren Verbindungen nötig ist.

Bei den ungesättigten Verbindungen findet, wie schon erwähnt, der Übergang der Rechts- in Linksmoleküle und der Links- in Rechtsmoleküle allein mit Hilfe der unbesetzten Affinitäten statt, während bei allen relativ isomeren Modifikationen der Übergang von der einen in die andere lediglich durch Drehung um eine Bindungsachse zustande kommt.

Bei der der Theorie nach vorauszusehenden sehr viel größeren Leichtigkeit der Umwandlung dieser Isomeren kann man natürlich nicht erwarten, alle diese leicht veränderlichen Konfigurationen als solche darzustellen und zu charakterisieren.

So wird man voraussichtlich häufiger die vorübergehende Existenz der von Substanzen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen ableitbaren relativ isomeren Modifikationen aus der Veränderlichkeit des Drehungsvermögens der Lösungen bei verschiedener Konzentration oder Temperatur folgern müssen, als daß es gelingen dürfte, die drei α-, β-, γ-Modifikationen zu isolieren.

Die Zurückführung vieler Fälle von Veränderlichkeit im Drehungsvermögen auf die relative Isomerie entspricht der schon von Landolt[1]) geäußerten Meinung, daß man gewisse Veränderungen im Drehungsvermögen durch Änderungen „des gegenseitigen Abstands der Atome, ihrer Anordnung im Raume sowie der Atombewegung, welche die Existenz des Moleküls noch nicht gefährden", erklären müsse.

Durch die bei der Untersuchung über die optisch aktive Zimtsäure aufgefundene asymmetrische Induktion, die, wie gezeigt, von stabilen asymmetrischen Molekülen ausgehend auf die labilen der Theorie nach in asymmetrischen Formen denkbaren isomeren Gemische einen richtenden Einfluß ausübt, so daß besonders bei gleichzeitigem Erwärmen ein Überschuß der einen molekular-asymmetrischen Konfiguration entsteht, ist ein völlig neuer Weg entdeckt, um bei Körpern ohne asymmetrisches Kohlenstoffatom den Nachweis zu führen, daß sie in labilen molekular-asymmetrischen Modifikationen mit optischem Drehungsvermögen existieren können.

Zur Erforschung dieses völlig neuen, sehr ausgedehnten Forschungsgebietes ist es vor allem nötig, die Bedingungen zu studieren, unter denen die asymmetrische Induktion am besten zur Wirkung gelangt.

Schon die bisherigen Erfahrungen lassen deutlich erkennen, daß die Wirkung der von verschiedenen asymmetrischen Körpern ausgehenden asymmetrischen Induktion eine verschiedene ist.

Es muß deshalb die Wirkung möglichst vieler verschiedener asymmetrischer Verbindungen gegenüber der gleichen zu

---

[1]) Landolt, Drehungsvermögen Seite 210.

induzierenden Substanz einer vergleichenden Untersuchung unterzogen werden.

Ebenso werden die gleichen induzierenden Körper auf Verbindungen der gleichen Kategorie verschieden wirken, wie schon eine Reihe orientierender Versuche, die mit anderen ungesättigten Verbindungen ausgeführt wurden, gelehrt hat, auf deren eingehende Beschreibung später zurückgekommen wird.

Ferner ist es notwendig, den Einfluß der Temperatur, der Zeit und der aufeinander wirkenden Mengen auf den Grad der asymmetrischen Induktion bei einer möglichst großen Reihe von Kombinationen eingehend zu studieren.

Im Hinblick auf die Vielfältigkeit der noch zu lösenden Fragen richte ich an die Herren Fachgenossen die Bitte, mir das neuerschlossene Arbeitsgebiet noch auf längere Zeit zur ungestörten Bearbeitung zu überlassen.

Über die asymmetrische Synthese von l- und d-Isovaleriansäure[1]) mit Hilfe der asymmetrischen Induktion.

Von

Emil Erlenmeyer.

(Aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt zu Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 9. Mai 1914.)

Emil Fischer[2]) hat bei Gelegenheit seiner klassischen Untersuchungen in der Zuckergruppe den Begriff der asymmetrischen Synthese aufgestellt.

Er fand, daß bei einmal vorhandener Asymmetrie der Moleküle auch der weitere Aufbau in asymmetrischem Sinne erfolgt: „Denkt man sich nun die Mannononose, die aus der Mannose durch solche einseitige, dreimalige Anlagerung von Blausäure entsteht, so gespalten, daß die ursprüngliche Hexose zurückgebildet wird, so würde das zweite Produkt mit 3 Kohlenstoff auch ein optisch aktives System sein."

Wenn diese Spaltung sich in dem vorliegenden Falle auch nicht durchführen läßt, so muß man doch zugeben, daß E. Fischer mit der Darstellung der Mannononose auf diesem Wege auch das erste Beispiel einer asymmetrischen Synthese ausgeführt hat.

Das Wesentliche bei dieser Art der asymmetrischen Synthese ist, daß die ungesättigte CO-Gruppe durch das vorhandene asymmetrische Radikal beeinflußt, die Elemente der Blausäure unter Bildung der asymmetrischen —CHOH—CN-Gruppe nur in einer Form addiert.

Die ersten analogen asymmetrischen Synthesen hat dann Mac Kenzie[3]) ausgeführt, bei denen es gelang, die neugebildete

[1]) Gemeint ist die zweite, als Methyläthylessigsäure zu bezeichnende Isovaleriansäure.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, 3230, 1904.

[3]) Journ. Chem. Soc. **85**, 1249; ebenda **87**, 1373; **89**, 365; **91**, 1215.

asymmetrische Gruppe von der beeinflussenden asymmetrischen Gruppe zu trennen und ihre Asymmetrie durch Feststellung ihrer optischen Aktivität zu beweisen.

Ausgehend von Carbonylverbindungen gelang ihm die Bildung von l-Mandelsäure durch Reduktion des Benzoylameisensäure-l-menthylesters, ferner aus dem gleichen Ester durch Grignardsche Reaktion die Bildung von l-Phenyläthylglykolsäure. Endlich erhielt er l-Milchsäure durch Reduktion des Brenztraubensäure-l-menthylesters. Durch die Grignardsche Reaktion erhielt er weiter l-Atrolactinsäure, ausgehend von Menthylbenzoylformiat und die entstehende d-Säure aus dem Brenztraubensäure-l-menthylester und die d-Phenylisobutylglykolsäure ausgehend von l-Bornylbenzoylformiat.

Auch die erste asymmetrische Synthese, ausgehend von einem Äthylenderivat führte Mac Kenzie zusammen mit Wren aus, indem er aus den Fumarsäure-d und l-Bornyl- und Menthylester durch Oxydation die optisch aktiven Weinsäuren erhielt.

Durch die Bildung des d- bzw. l-Dibromids der Zimtsäure durch Bromaddition an das gemischte Zinksalz von l- bzw. d-Phenylmilchsäure und Zimtsäure habe ich zusammen mit G. Hilgendorff[1]) einen weiteren interessanten Fall festgelegt, bei dem die asymmetrische Synthese in dem ihr von E. Fischer gegebenen Sinne auch bei einer ungesättigten Kohlenstoffverbindung erfolgt.

Durch den in der voranstehenden Abhandlung gelieferten Nachweis der von aktiven Körpern mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen auf ungesättigte Verbindungen ausgeübten asymmetrischen Induktion, die die ungesättigten Verbindungen in eine asymmetrische Konfiguration zwingt, die dann die asymmetrische Aufnahme herantretender Addenden zur Folge hat findet das Wesen der bisher besprochenen asymmetrischen Synthesen ihre durchaus befriedigende Erklärung.

Im Jahre 1904 hat Marckwald[2]) eine asymmetrische Synthese der l-Isovaleriansäure beschrieben, die ihrem Wesen nach prinzipiell verschieden ist von den bisher angeführten asymmetrischen Synthesen.

[1]) Diese Zeitschr. 43, 445.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 349, 1904.

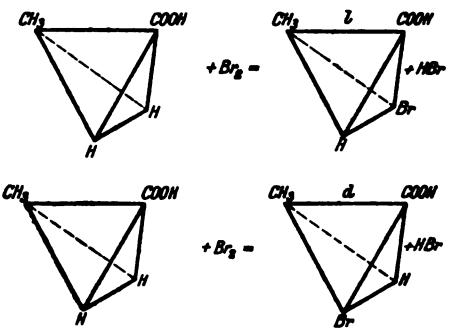
Es gelang ihm nämlich durch Zersetzung des sauren Brucinsalzes der Methyläthylmalonsäure unter Kohlensäureabspaltung aktive Isovaleriansäure zu gewinnen.

Es ist eine nunmehr schon recht alte Erfahrungstatsache, daß bei der synthetischen Darstellung einer Verbindung mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom durch Substitution diese stets optisch inaktiv entsteht, d. h. als ein Gemisch gleicher Mengen der d- und der l-Modifikation.

Z. B.:

$$CH_3—CH_2—COOH + Br_2 = CH_3—CHBr—COOH + HBr.$$

Macht man sich den Vorgang der Bildung der r-α-Brompropionsäure stereochemisch mit Hilfe der Modelle klar, so sieht man, daß nebeneinander die zwei folgenden Reaktionen verlaufen, von denen die eine zur d-α-Brompropionsäure, die andere zu der gleichen Menge l-α-Brompropionsäure führt, die dann zusammen die entstehende d-l-α-Brompropionsäure ausmachen.



d. h. bei der Bildung des l-Moleküls wird ein anderes Wasserstoffatom gegen Brom ausgetauscht als bei der Bildung des d-Moleküls.

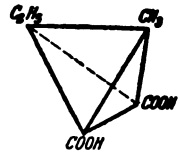
Der Umstand, daß bei der Substitution die Racemverbindung, die aus gleichen Teilen der d- und l-Verbindung besteht, gebildet wird, zwingt zu dem Schluß, daß die beiden Wasserstoffatome der CH_2-Gruppe gleich oft substituiert werden, was nur denkbar ist, wenn diese die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit besitzen.

Wie an den Modellen leicht zu sehen ist, liegen die beiden Wasserstoffatome diesseits und jenseits einer durch die Papierebene repräsentierten Symmetrieebene des Moleküls.

Es muß daher der Satz Gültigkeit haben, daß zwei Wasserstoffatome oder zwei andere identische Atome oder Gruppen, die diesseits und jenseits einer Symmetrieebene des Moleküls gebunden sind, einem identischen Reagens gegenüber gleiche Reaktionsgeschwindigkeit besitzen und deshalb mit diesem gleich oft unter Bildung genau gleicher Mengen der theoretisch denkbaren Reaktionsprodukte in Reaktion treten.

Dieser aus der Erfahrung gefolgerte Satz muß auch auf den von Marckwald bearbeiteten Fall angewandt werden.

Schreibt man die Methyläthylmalonsäure analog der Propionsäure:



so sieht man, daß hier zwei Carboxylgruppen diesseits und jenseits einer Symmetrieebene des Moleküls liegen.

Läßt man auf diese zweibasische Säure ein Mol.-Gew. einer einsäuerigen Base einwirken, so muß sich diese gleichoft sowohl mit der einen als mit der anderen Carboxylgruppe verbinden, unter Bildung von zwei sauren Salzen, die sich bei Anwendung symmetrischer Basen, analog wie bei der Bildung der d-l-α-Brompropionsäure, in Form von zwei spiegelbildlichen Modifikationen von gleichen Eigenschaften in gleicher Menge bilden müssen.

Dieselbe Ansicht bezüglich der Bildung der sauren Salze mit symmetrischen Basen hat auch Marckwald geäußert.

Da die Bildung der gleichen Mengen der beiden sauren Salze allein von der durch die symmetrische Lage der beiden Carboxyle bedingten gleichen Reaktionsgeschwindigkeit abhängt und a priori kein Grund einzusehen ist, warum ein und dieselbe, wenn auch asymmetrische Base, wie das Brucin sich bei der Bildung der sauren Salze in einem anderen Verhältnis auf die beiden symmetrisch gelegenen Carboxyle verteilen sollte, so war zu erwarten, daß sich bei Einwirkung von 1 Mol.-Gew. Brucin auf 1 Mol.-Gew. Methyläthylmalonsäure genau gleiche Mengen der zwei denkbaren sauren Brucinsalze bildeten, die jedoch des eingetretenen Brucins wegen, weder spiegelbildlich

noch kongruent sind und nach dem früher aufgestellten Satz 3 [1]) in Löslichkeit und anderen Eigenschaften verschieden und daher trennbar sein müssen in ein saures Brucinsalz, das nach Verlust der unbesetzten Carboxylgruppe zur d-Isovalerinsäure und in ein anderes Brucinsalz, das nach Abspaltung von Kohlensäure zur l-Isovaleriansäure führt.

Auch Marckwald spricht in seiner ersten Abhandlung die Meinung aus, daß die beiden Brucinsalze in ihrer Löslichkeit verschieden sein dürften und daß sie nicht in erheblich verschiedener Menge entstünden.

Unter Voraussetzung der Richtigkeit dieser Schlußfolgerung war es undenkbar, daß das Gemisch gleicher Teile der sauren Brucinsalze bei der Kohlensäureabspaltung aktive Isovaleriansäure lieferte.

Da aber Marckwald angibt, mit dem „schön krystallisierenden Brucinsalz" den Versuch ausgeführt zu haben, so dachte ich mir zuerst, daß auf Grund der auch von Marckwald eingeräumten verschiedenen Löslichkeit der beiden sauren Brucinsalze bei der Krystallisation des äquimolekularen Gemischs eine teilweise Trennung stattgefunden haben könnte, so daß das von Marckwald benutzte Salz bereits einen Überschuß des einen Salzes enthielt und dann naturgemäß bei der Zersetzung bis zu einem gewissen Betrag aktive Isovaleriansäure lieferte.

Durch eine Reihe von Versuchen, die mit dem Gemisch der beiden sauren Brucinsalze ausgeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß sich in der Tat durch fortgesetzte Krystallisation aus diesem Salzgemisch Fraktionen von verschiedener Löslichkeit, von verschiedenem Drehungsvermögen und von verschiedenen Zersetzungspunkten gewinnen lassen, die bei der Zersetzung Isovaleriansäuren von verschieden starker Linksdrehung lieferten. Die aus der am leichtesten löslichen Fraktion erhaltene Isovaleriansäure drehte beträchtlich mehr als die von Marckwald beschriebene Säure.

Eine vollständige Trennung in ein Salz, das linksdrehende und in ein Salz, das rechtsdrehende Isovaleriansäure liefert, gelang jedoch bisher selbst bei lang fortgesetzter Krystallisation nicht.

[1]) Diese Zeitschr. 52, 443.

Nach den gewonnenen Resultaten war es also nicht ausgeschlossen, daß das von Marckwald zu seinem Versuche benutzte „schön krystallisierende" Brucinsalz durch die Krystallisation bereits eine der Komponenten angereichert enthielt und deshalb aktive Isovaleriansäure lieferte.

Alsdann wäre die Bildung der von Marckwald erhaltenen aktiven Isovaleriansäure einfach auf eine Trennung zweier verschieden löslicher Brucinsalze zurückzuführen gewesen und nicht auf eine asymmetrische Synthese.

Lag dagegen eine asymmetrische Synthese vor, so mußte das sich beim Zusammenbringen von Methyläthylmalonsäure und Brucin bildende Brucinsalzgemisch auch ohne vorherige Krystallisation bei der Zersetzung aktive Isovaleriansäure liefern.

Deshalb wurde bei einem Versuch das Gemisch der beiden Brucinsalze in einem weiten Reagensrohr dargestellt, in diesem zur Trockne eingedampft und dann gleich weiter geschmolzen, bis alle Kohlensäure abgespalten war.

Die in gewöhnlicher Weise vorgenommene Verarbeitung ergab eine Isovaleriansäure von der gleichen Aktivität, wie sie Marckwald bei seiner Säure beobachtet hatte.

Hieraus ergibt sich, daß bei der Reaktion tatsächlich eine partielle asymmetrische Synthese erfolgt ist.

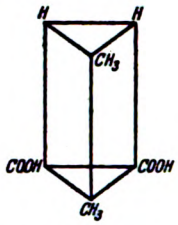
Das Gelingen dieser asymmetrischen Synthese setzt aber voraus, daß die nach den eingangs mitgeteilten Betrachtungen bei der Einwirkung von Brucin auf Methyläthylmalonsäure zu gleichen Teilen zu erwartenden sauren Brucinsalze in verschiedenen Mengen entstehen.

Solange man, wie dies bei den obigen Betrachtungen geschehen ist, die Methyläthylmalonsäure aus lauter symmetrischen, in ihrer Konfiguration unveränderlichen Molekülen bestehend betrachtet, mußten unbedingt gleiche Mengen der beiden Salze entstehen, da die beiden symmetrisch gelegenen Carboxyle bei ihrer gleichen Reaktionsgeschwindigkeit nur gleich oft reagieren können.

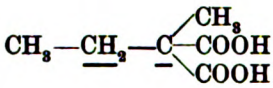
Das Resultat des Versuchs, d. i. die Bildung ungleicher Mengen der beiden Salze setzt eine Verschiedenheit der beiden Carboxyle in der Reaktionsgeschwindigkeit voraus und diese ist wiederum nur denkbar, wenn die Carboxyle aus der ursprünglichen symmetrischen Lage zum Teil in eine asymme-

trische Lage gebracht worden sind, und zwar induziert durch die Asymmetrie des Brucins.

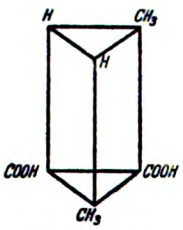
Drückt man die Formel der symmetrischen Methyläthylmalonsäure durch das Modell aus:



in dem die beiden unterstrichenen Kohlenstoffatome in der Formel:



weggelassen sind, so sieht man, daß sich leicht durch Drehung um die C—C$_1$-Achse die folgende relativ isomere Konfiguration:



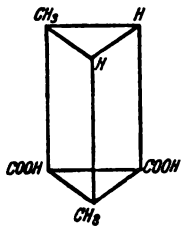
die nicht mehr symmetrisch ist, bilden kann, bei der die der Methylgruppe des Äthyls zunächst stehende Carboxylgruppe eine andere Reaktionsgeschwindigkeit besitzen muß, als die entfernter stehende Carboxylgruppe, wodurch es ohne weiteres verständlich wird, daß ein Überschuß von einem sauren Brucinsalz entsteht, das bei der Abspaltung von Kohlensäure zu einer aktiven Isovaleriansäure führt.

Wenn nun die Bildung der unsymmetrischen, relativ isomeren Modifikation der Methyläthylmalonsäure die Folge der von dem asymmetrischen Brucinmolekül ausgehenden asymmetrischen Induktion ist, so mußte diese Induktion unabhängig von der Salzbildung stattfinden und man mußte erwarten, den gleichen Erfolg mit nicht basischen Substanzen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen erzielen zu können.

Die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung hat sich nun in ausgezeichneter Weise durch das Experiment beweisen lassen.

Man braucht nur ein inniges Gemisch von d-Weinsäure mit Methyläthylmalonsäure bei 168—170° zu verschmelzen, so erhält man nach der Beendigung der Kohlensäureabspaltung aus der Schmelze mit Rechtsweinsäure linksdrehende Isovaleriansäure von dem spezifischen Drehungsvermögen $[\alpha]_D = -1{,}9°$. Die so erhaltene Isovaleriansäure wurde destilliert, ohne ihre Aktivität einzubüßen, sie wurde in ihr Silbersalz übergeführt, das bei der Analyse stimmende Werte gab, aus dem Silbersalz wurde die Säure wiedergewonnen und gezeigt, daß die Aktivität erhalten blieb und daß sie bei der Titration auf Isovaleriansäure stimmende Werte gab.

In der nämlichen Weise bearbeitet ergab die Schmelze von l-Weinsäure mit Methyläthylmalonsäure rechtsdrehende Isovaleriansäure. Die Entstehung der rechtsdrehenden Isovaleriansäure setzt voraus, daß die Methyläthylmalonsäure beeinflußt durch die Linksweinsäure vorher zum Teil in die folgende relativ isomere Konfiguration umgewandelt worden ist:

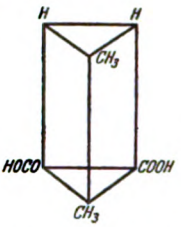


die das Spiegelbild von der bei der d-Weinsäureschmelze angenommenen relativ isomeren Modifikation vorstellt und die beim Erhitzen unter Abspaltung der anderen Carboxylgruppe zu der entgegengesetzt drehenden Isovaleriansäure führen muß.

Endlich wurde noch bei zwei Versuchen die Isovaleriansäure durch Schmelzen der Methyläthylmalonsäure für sich allein dargestellt.

Die erhaltene Isovaleriansäure war bei beiden Versuchen inaktiv, was ja auch selbstverständlich ist, da eine Bevorzugung einer der beiden Carboxylgruppen bei der Abspaltung von Kohlensäure ausgeschlossen ist, so lange sich diese in gleicher

Lage diesseits und jenseits einer Symmetrieebene des Moleküls der Methyläthylmalonsäure befinden:



Die Untersuchung lehrt also, daß die Bildung der aktiven Isovaleriansäure sowohl aus dem sauren Brucinsalz der Methyläthylmalonsäure, als auch bei der Schmelze dieser Säure mit d- bzw. l-Weinsäure eine asymmetrische Synthese vorstellt.

Während aber bei den vorher besprochenen asymmetrischen Synthesen ungesättigte Verbindungen durch die asymmetrische Induktion mit Hilfe eines asymmetrischen Moleküls in eine asymmetrische Konfiguration gebracht werden, in der sie herantretende Addenden asymmetrisch aufnehmen, beruht die hier beschriebene asymmetrische Synthese der Isovaleriansäure darauf, daß die für gewöhnlich symmetrische Methyläthylmalonsäure, die dem im theoretischen Teil der voranstehenden Abhandlung angeführten Typus:

$$\begin{array}{l} CH_2R \\ | \\ CX_2R_1 \end{array}$$

angehört, durch die asymmetrische Induktion mit Hilfe des asymmetrischen Moleküls in die eine bzw. die dazu spiegelbildliche asymmetrische Konfiguration zwingt, in der dann die Kohlensäureabspaltung zu aktiven Molekülen der Isovaleriansäure führen muß.

Bei allen asymmetrischen Synthesen hat man also die von asymmetrischen Molekülen ausgehende asymmetrische Induktion als die Ursache des asymmetrischen Verlaufs der Synthese zu betrachten.

Experimenteller Teil.

Gemeinsam mit F. Landsberger.

1. Saures Brucinsalz der Methyläthylmalonsäure.

Beim Zusammenbringen einer konzentrierten alkoholischen Lösung von 1 Mol.-Gew. Methyläthylmalonsäure und einer gleichfalls konzentrierten alkoholischen Lösung von 1 Mol.-Gew. Bru-

cin scheidet sich das entstehende saure Brucinsalz bis zu etwa 90% als Krystallbrei ab. Die abgesaugte Substanz schmolz unter Zersetzung bei 174°.

Zur Feststellung weiterer Eigenschaften des aus den zwei isomeren Salzen bestehenden Gemisches wurden bei einem Versuch 11,68 g Säure in 50 ccm Alkohol gelöst und mit einer Lösung von 31,52 g Brucin in 150 ccm Alkohol in einer Porzellanschale vereinigt und sogleich ohne Rücksicht auf die erfolgende Abscheidung auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft.

Da das Salz, wie die Verwitterung und die angestellte Jodoformreaktion bei einer aus Alkohol krystallisierten Probe zeigt, Krystallalkohol enthält, wurden 2,2114 g des durch Eindampfen gewonnenen Gemisches lufttrocken abgewogen und sodann bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Gewichtsabnahme betrug 0,3024 g, während sich für die Formel $C_{29}H_{36}N_2O_8 + 2\,C_2H_5OH$ 0,3206 g berechnet.

Danach werden bei der Salzbildung 2 Moleküle Krystallalkohol aufgenommen.

Da das Salzgemisch in Methylalkohol löslicher ist als in Äthylalkohol, so wurde die Drehung des getrockneten Salzes in Methylalkohol bestimmt.

0,5944 g in Methylalkohol gelöst und auf 20 ccm aufgefüllt drehten in 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}63°$ $c = 2{,}972$, daher $[\alpha]_D = -21{,}2°$.

Von einer bei gewöhnlicher Temperatur durch Schütteln mit absolutem Alkohol hergestellten gesättigten Lösung hinterließen 10 ccm beim Eindampfen 0,1622 g. Danach lösen 100 ccm Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur nur 1,62 g des Salzgemisches.

2. Beweis für die allmähliche Trennung des Gemisches der sauren Brucinsalze der Methyläthylmalonsäure bei fortgesetzter Krystallisation aus Alkohol.

Ohne auf die ermüdenden Details der fraktionierten Krystallisation einzugehen, sei nur erwähnt, daß einerseits die jeweils aus den heißen alkoholischen Lösungen abgeschiedenen Krystallisationen immer wieder von neuem aus Alkohol krystallisiert wurden, um auf diese Weise das am schwersten lösliche Brucinsalz anzureichern, während andererseits zur Gewinnung des leichter löslichen Brucinsalzes die Mutterlaugen eingedampft wurden.

Bemerkenswert ist, daß, sobald man mit der Krystallisation

des gemischten Salzes beginnt, die Zersetzungspunkte der Krystallisationen, die die schwerer löslichen Anteile enthalten, als auch der aus den Mutterlaugen gewonnenen sinken.

Der Zersetzungspunkt des ursprünglichen Salzgemisches lag bei 174°, bei fortgesetzter Krystallisation wurden bei den einzelnen, farblosen Salzfraktionen allmählich von 168° bis 153° sinkende Zersetzungspunkte beobachtet.

Desgleichen läßt sich deutlich beobachten, wie sich die Salzfraktionen bei fortgesetzter Krystallisation in der Löslichkeit differenzieren. Während 100 ccm Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur von dem ursprünglichen gemischten Salz 1,62 g lösten, wurde durch die Fraktionierung eine schwerst lösliche Fraktion erhalten, von der sich unter genau gleichen Bedingungen nur mehr 0,5 g in 100 ccm Alkohol lösten.

Das für das ursprüngliche Salzgemisch gefundene Drehungsvermögen, gemessen an alkoholfreiem Salz in Methylalkohol, betrug $[\alpha]_D = -21{,}2°$.

Bei einer längere Zeit fortgesetzten Fraktionierung wurde eine schwerst lösliche Fraktion nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz in methylalkoholischer Lösung gemessen und ergab:

0,7983 g in 20 ccm Methylalkohol gelöst, drehte im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}13°$, $c = 4{,}0$ berechnet

$$[\alpha]_D = -3{,}2°,$$

während die aus der gleichen Fraktionierung stammende leichtest lösliche Fraktion, in der gleichen Weise polarisiert, das folgende Resultat lieferte:

0,7981 g in 20 ccm Methylalkohol gelöst drehte im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}25°$, $c = 4{,}0$ berechnet

$$[\alpha]_D = -6{,}2°.$$

Der Gewichtsverlust beim Trocknen des ersten Präparats bei 105° betrug 0,1722 g, während sich für 2 Mol. Alkohol 0,1589 g berechnet, der des zweiten 0,0958 statt 0,0888 g.

3. Feststellung abweichender Drehwerte bei dem ursprünglichen Gemisch des sauren Brucinsalzes der Methyläthylmalonsäure, als auch bei den verschieden löslichen, durch Krystallisation erhaltenen Fraktionen.

Ein nach der gleichen Methode, wie im 1. Abschnitt, hergestelltes Präparat des sauren Brucinsalzes der Methyläthylmalonsäure zeigte in zwei Punkten ein von dem zuerst beschrie-

benen Präparat abweichendes Verhalten. Beim Trocknen von 2,6362 g lufttrockenem Salz wurde nach 10stündigem Erhitzen bei 90° ein Gewichtsverlust von 0,2200 g festgestellt, während sich für 1 Mol. Alkohol 0,2001 g berechnet.

Von dem lufttrocknen Salz drehte 1 g in Methylalkohol gelöst — Vol. 26 ccm — $c = 3{,}84$ im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}37°$, d. i. $[\alpha]_D = -4{,}8°$, also viel weniger als das zuerst gewonnene $[\alpha]_D = -21°$ drehende Salz.

Von dem bei 90° getrocknetem Salz drehten 1,25 g in 25 ccm $c = 5$ im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}63$, d. i. $[\alpha]_D = -6{,}3°$.

Der Zersetzungspunkt lag wie bei dem zuerst beschriebenen Salz bei 173 bis 174°.

Die annähernde Gewichtskonstanz trat bei diesem Salz bereits nach einem für 1 Mol. Krystallalkohol berechneten Gewichtsverlust ein, während der bei dem ersten Salz festgestellte Gewichtsverlust 2 Molekülen Krystallalkohol entsprach. Ob bei weiterem Erhitzen noch ein weiterer Gewichtsverlust eingetreten wäre, konnte leider nicht mehr festgestellt werden.

Auch bei der Untersuchung einer schwerst und einer leichtest löslichen Fraktion, die bei lange festgesetzter fraktionierter Krystallisation des ursprünglichen Salzes gewonnen worden waren, wurden gleichfalls Abweichungen von den im 2. Abschnitt beschriebenen Fraktionen nachgewiesen.

3,1829 g schwerst lösliche Fraktion verlor beim Trocknen bei 80° 0,2296 g, während sich für 1 Mol. Alkohol 0,2598 g berechnet.

2,2776 g der leichtest löslichen Fraktion verlor unter den gleichen Bedingungen 0,2002 g, für 1 Mol. Alkohol berechnet 2,2233 g.

0,6153 g der getrockneten, schwerst löslichen Fraktion in 20 ccm Methylalkohol gelöst, $c = 3{,}6765$ drehten im 2-dcm-Rohr $\alpha = 0{,}41$, d. i.

$$[\alpha]_D = -6{,}6°.$$

0,6139 g des getrockneten, leichtest löslichen Salzes in 20 ccm Methylalkohol gelöst, $c = 3{,}0695$ drehten im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}56°$, d. i.

$$[\alpha]_D = -18°.$$

Von dem $-6{,}6°$ drehenden Salz lösten sich 0,5 g bei Zimmertemperatur in 100 ccm absolutem Alkohol, von dem $-18°$ drehenden Salz dagegen unter genau gleichen Bedingungen 1,63 g in 100 ccm absolutem Alkohol.

Die mitgeteilten Versuche beweisen zwar die Existenz von sauren Brucinsalzen verschiedener Eigenschaften, lassen aber noch nicht mit Sicherheit erkennen, ob die festgestellten Unterschiede bei den untersuchten Salzen allein auf die Trennung durch die

Krystallisation zurückzuführen sind, oder ob man auch mit Schwankungen in der Konfiguration infolge der größeren oder geringeren Erhitzungsdauer, die es bei der Fraktionierung erleidet, oder beim Trocknen und dadurch bewirkten Schwankungen in den Eigenschaften zu rechnen hat.

Nach Auffindung der Darstellung aktiver Isovaleriansäure bei der Weinsäure-Methyläthylmalonsäureschmelze, wurden die Trennungsversuche an dem sauren Brucinsalz nicht mehr weiter fortgesetzt.

4. Bildung von verschieden stark drehenden Isovaleriansäurepräparaten aus einer schwerst und einer leichtest löslichen Fraktion.

Zur Darstellung der Isovaleriansäure aus den sauren Brucinsalzen wurden diese in einem weiten Reagensrohr auf 170° erhitzt, bis die Kohlensäureentwicklung beendet ist, das Reaktionsprodukt sodann in heißem Wasser gelöst, mit der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit Wasserdampf destilliert. Aus dem Destillat wurde die Isovaleriansäure mit Äther extrahiert und nach dem Verjagen des Äthers destilliert und der bei 172° übergehende Anteil polarisiert.

Eine der aus dem am schwersten löslichen Anteile gewonnene Isovaleriansäure drehte, in Äther gelöst, $c = 5{,}23$ im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}29^\circ, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -2{,}8^\circ$$

während die aus dem bei der gleichen Fraktionierung erhaltenen leichtest löslichen Anteil erhaltene Säure in Äther gelöst $c = 4{,}86$ im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}34^\circ$ drehte, d. i.

$$[\alpha]_D = -3{,}5^\circ.$$

Der schwerst lösliche Anteil wurde nun noch fünfmal aus 150 ccm Alkohol krystallisieren gelassen. Die bei der fünften Krystallisation erhaltene Substanz zersetzte sich bei 158—159° und gab bei der Zersetzung Isovaleriansäure von schwächerem Drehungsvermögen.

In Äther gelöst $c = 4{,}2$ wurde im 1-dcm-Rohr im Mittel abgelesen

$$\alpha = -0{,}06^\circ, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -1{,}4^\circ.$$

5. Darstellung der Isovaleriansäure aus nicht krystallisiertem Brucinsalz der Methyläthylmalonsäure.

10,25 g des durch Eindampfen der vereinigten alkoholischen Lösungen von Methyläthylmalonsäure und Brucin erhaltenen Salzgemischs wurde auf Isovaleriansäure verarbeitet. Die bei 173° übergehende Säure drehte in ätherische Lösung bei einer Konzentration $c = 9{,}13$ im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}25°$, d. i.

$$[\alpha]_D = -2{,}7°.$$

Um nun ganz sicher zu sein, daß bei der Darstellung des zur Schmelze verwendeten Brucinsalzgemischs keine Trennung stattfindet, wurde bei einem zweiten Versuch 2,92 g Methyläthylmalonsäure und 7,88 g Brucin in einem weiten Reagensrohr mit 80 ccm Alkohol übergossen und gut umgerührt und sodann auf dem Wasserbad erhitzt, bis der Alkohol vollständig verjagt war. Das zurückbleibende Salzgemisch wurde nunmehr in dem gleichen Reagensrohr geschmolzen, bis alle Kohlensäure abgespalten war.

Die wie gewöhnlich aus der Schmelze herausgearbeitete Isovaleriansäure ging bei 176° über und zeigte in ätherischer Lösung die Drehung $\alpha = -0{,}10°$ im 2-dcm-Rohr und bei $c = 3{,}57$, d. i. $[\alpha]_D = -1{,}4°$.

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, läßt sich die Tatsache der Bildung aktiver Isovaleriansäure aus dem Gemisch der stereoisomeren sauren Brucinsalze nur dann verstehen, wenn die Methyläthylmalonsäure, unabhängig von der Salzbildung, durch die asymmetrische Induktion des Brucinmoleküls vorher eine teilweise relativ isomere Konfigurationsänderung erfahren hat. Alsdann mußte man erwarten, auch mit nicht basischen aktiven Substanzen bei höherer Temperatur einen ähnlichen Einfluß auf das Molekül der Methyläthylmalonsäure ausüben zu können.

Deshalb wurde untersucht, in welcher Weise sich die Methyläthylmalonsäure in einer Schmelze mit d-Weinsäure verhält.

6. Bildung von l-Isovaleriansäure bei der Schmelze mit d-Weinsäure.

Versuch 1.

1 Mol.-Gew. Methyläthylmalonsäure = 1,46 g und 1 Mol.-Gew. d-Weinsäure = 1,5 g wurden innig gemischt in einem Reagensrohr auf 168 bis 170° so lange erhitzt, bis alle Kohlen-

säure abgespalten war. Eine Zersetzung des Weinsäuremoleküls findet unter diesen Bedingungen bekanntlich nicht statt. Da die bei der Schmelze gebildete Metaweinsäure, wie besondere Versuche lehrten, in Äther absolut unlöslich ist, so wurde zur Gewinnung der gebildeten Isovaleriansäure die Schmelze mit Äther extrahiert und die 20 ccm betragende ätherische Lösung, deren Konzentration der Berechnung nach etwa 5 ist, im 2-dcm-Rohr polarisiert:

$$\alpha = -0{,}12^\circ \text{ entsprechend } [\alpha]_D = -1{,}2^\circ.$$

Bei stärkerer Konzentration $c = 9{,}1$ drehte die ätherische Lösung im 2-dcm-Rohr:

$$\alpha = -0{,}33^\circ, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -1{,}8^\circ.$$

Versuch 2.

Bei dem zweiten Versuch wurde mit der gleichen Menge Methyläthylmalonsäure die doppelte Menge Weinsäure verschmolzen. Die entstandene Isovaleriansäure drehte in ätherischer Lösung bei der Konzentration $c = 3{,}63$ im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}14^\circ, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -1{,}9^\circ.$$

Versuch 3.

Bei einem dritten Versuch wurden 3 g der Methyläthylmalonsäure mit 6 g Weinsäure verschmolzen. Die Schmelze wurde mit Wasser und Äther geschüttelt. Die ätherische Lösung, deren c etwa 5 betrug, drehte im 2-dcm-Rohr:

$$\alpha = -0{,}19^\circ \text{ d. i. } [\alpha]_D = -1{,}9^\circ.$$

Aus der wässerigen Lösung wurde die Weinsäure in Form von Weinstein abgeschieden.

0,2210 g gaben 0,1036 K_2SO_4.

Ber. f. $C_4H_5O_6K$		Gef.
K	20,75	20,98.

Versuch 4.

Bei dem vierten Versuch, der genau wie der vorhergehende, ausgeführt wurde, wurde die gebildete Isovaleriansäure destilliert.

Die Säure ging bei 176° über.

0,5361 g in 15 ccm Äther gelöst, $c = 3{,}57$, drehten im 2-dcm-Rohr

$$\alpha = -0{,}10 \text{ d. i. } [\alpha]_D = -1{,}4^\circ.$$

Ein Teil dieser Säure wurde in das Silbersalz übergeführt und dieses analysiert.

0,1932 Ag-Salz gaben 0,0995 g Ag

Ber. f. $C_5H_9O_2Ag$		Gef.
Ag	51,67	51,49

Die wässerige Lösung des Silbersalzes wurde darauf mit Salzsäure versetzt und nach Filtration vom Chlorsilber ausgeäthert. Ein Teil der ätherischen Lösung zeigte noch einen Drehungswinkel $\alpha = -0{,}11^0$, 0,2992 der beim Abdestillieren des Äthers zurückbleibenden Säure verbrauchten bei der Titration mit $^n/_{10}$-Natronlauge 29,1 ccm, während sich für Isovaleriansäure 29,32 ccm berechnen.

7. Bildung von d-Isovaleriansäure beim Verschmelzen von Methyläthylmalonsäure mit l-Weinsäure.

Nach den bei den Schmelzen mit d-Weinsäure erhaltenen Resultaten war zu erwarten, daß bei der Schmelze von l-Weinsäure mit Methyläthylmalonsäure rechtsdrehende Isovaleriansäure erhalten würde.

1,46 g Methyläthylmalonsäure wurden mit 1,5 l-Weinsäure fein gepulvert und innig gemischt eine halbe Stunde auf 160 bis 170° erhitzt und die Schmelze sodann wie bei den Versuchen mit d-Weinsäure verarbeitet.

Die ätherische Lösung, die etwa 1 g Isovaleriansäure enthielt, wurde auf 12 ccm eingeengt, so daß $c = 8{,}4$ und im 1-dcm-Rohr untersucht. Die beobachtete Drehung betrug

$$\alpha = +0{,}12^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = +1{,}4^0.$$

8. Bildung von inaktiver Isovaleriansäure bei der Schmelze von Methyläthylmalonsäure für sich.

Um zu zeigen, daß die Entstehung der aktiven Isovaleriansäure allein auf die Beeinflussung der Methyläthylmalonsäure durch die gleichzeitig in der Schmelze vorhandene aktive Weinsäure zurückzuführen ist, wurden bei zwei Versuchen je 1,46 g Methyläthylmalonsäure für sich allein bis zum Aufhören der Kohlensäureentwicklung etwa eine halbe Stunde auf 160° erhitzt.

Die im Reagensrohr verbleibende Isovaleriansäure erwies sich in beiden Fällen bei der Prüfung ihrer ätherischen Lösung als inaktiv.

Darstellung von linksdrehendem Benzaldehyd durch asymmetrische Induktion mit Hilfe von Rechtsweinsäure, Überführung desselben in linksdrehendes Mandelsäurenitril und rechtsdrehende Mandelsäure, ein Beitrag zur Erkenntnis enzymatischer Reaktionen.

Von

Emil Erlenmeyer.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Kaiserlichen Biologischen Anstalt zu Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 9. Mai 1914.)

Nach den bei den vorhergehenden Untersuchungen erzielten Erfolgen war ich zwar nicht mehr im Zweifel, daß auch bei den von Emil Fischer und Mc Kenzie beobachteten asymmetrischen Synthesen mit Carbonylverbindungen der asymmetrischen Synthese eine auf die asymmetrische Induktion zurückzuführende asymmetrische Einstellung der verwendeten Carbonylverbindungen vorausgegangen sein mußte, trotzdem erschien es mir wünschenswert, die Richtigkeit dieser Anschauung an einem besonders überzeugenden Beispiel zu beweisen.

Schon vor Jahren hatte ich die Absicht, mit Hilfe eines Alkaloids zu versuchen, direkt aktives Mandelsäurenitril zu gewinnen, wurde aber bisher durch andere Arbeiten an der Ausführung meines Vorhabens gehindert.

In der Zwischenzeit ist es nun Rosenthaler[1]) gelungen, zu zeigen, daß mit Hilfe des Enzyms Emulsin die Bildung des Mandelsäurenitrils tatsächlich asymmetrisch verläuft, und neuerdings fanden Bredig und Fiske[2]), daß man die asymmetrische Synthese des gleichen Körpers auch mit Hilfe von Alkaloiden asymmetrisch bewerkstelligen kann.

---

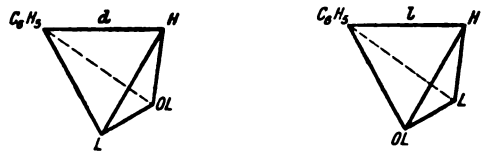
[1]) Diese Zeitschr. **14**, 238, 1908.

[2]) Diese Zeitschr. **46**, 7, 1912.

Beide Forscher sind der Meinung, daß bei der asymmetrischen Synthese des Mandelsäurenitrils eine Beschleunigung der Reaktion zugunsten der Bildung eines der möglichen asymmetrischen Modifikationen anzunehmen sei, die bei Rosenthaler durch das Emulsin, bei Bredig durch das Alkaloid bewirkt werden müßte.

Die in den beiden ersten Abhandlungen mitgeteilten Erfahrungen führten mich jedoch zu einer anderen Erklärung der asymmetrischen Synthese im allgemeinen und der asymmetrischen Synthese des Mandelsäurenitrils im speziellen, deren Richtigkeit sich durch das Experiment beweisen ließ.

Nach meiner Theorie hat man den Benzaldehyd aus $\pm$ Molekülen der Formel $C_6H_5-C\begin{matrix}L\\OL\\H\end{matrix}$ bestehend zu betrachten:



Wie bei den d- und l-Zimtsäuren hat man sich auch bei den spiegelbildlichen Benzaldehydmolekülen eine leichte Umwandelbarkeit der Rechts- in die Linksmodifikation und umgekehrt vorzustellen.

Man konnte daher auch beim Benzaldehyd erwarten, daß bei der Einwirkung einer induzierenden asymmetrischen Substanz ein Überschuß der einen asymmetrischen Konfiguration des Benzaldehyds gebildet würde, deren Vorhandensein sich durch optische Aktivität und Überführung des optisch aktiven Benzaldehyds in aktives Mandelsäurenitril und aktive Mandelsäure zu erkennen geben mußte.

Da an eine Aktivierung des Benzaldehyds durch Zusammenschmelzen mit Weinsäure nicht zu denken war, wurde versucht, durch längeres Erhitzen einer alkoholischen Lösung von Benzaldehyd und Weinsäure eine Aktivierung zu erzielen. Vor dem Erhitzen wurde die Drehung der Lösung bestimmt. Nach mehrstündigem Erhitzen ließ sich bereits eine Änderung im Drehungsvermögen der Lösung feststellen, und zwar zuerst meist eine Abnahme und nach weiterem Erhitzen eine Zunahme über

die Anfangsdrehung bis um etwa 0,40°. Nach 12 Stunden fand eine weitere Änderung im Drehungsvermögen nicht mehr statt.

Zur Feststellung der etwa erworbenen Aktivität des Benzaldehyds wurde ein bestimmter Teil der Lösung mit Wasser versetzt, der abgeschiedene Benzaldehyd mit Äther aufgenommen und die ätherische Lösung, nachdem sie säurefrei gewaschen war, auf Drehung geprüft.

Bei den bisher ausgeführten 6 Versuchen zeigten die Benzaldehydlösungen durchweg eine deutliche, bis $\alpha = -0{,}55^0$ betragende Linksdrehung. Die daraus berechneten spezifischen Drehwerte betrugen $[\alpha]_D = -1{,}6^0$ bis $-2{,}0^0$.

Die aus den linksdrehenden Benzaldehyden durch Blausäureaddition gewonnenen Mandelsäurenitrile waren gleichfalls linksdrehend; bei einem so gewonnenen Präparat, das ohne Verdünnung durch ein Lösungsmittel gedreht wurde, betrug der Drehungswinkel $\alpha = -1{,}75^0$, entsprechend $[\alpha]_D = -0{,}87^0$.

Bei der Verseifung des bei dem ersten Versuch gewonnenen Nitrils wurde Mandelsäure erhalten, deren erste Krystallisationen aus Benzol inaktiv waren, während die letzte, deren Krystalle zum Teil hemiedrisch ausgebildet waren, ein Drehungsvermögen

$$[\alpha]_D = +5^0$$

besaß und übereinstimmend mit den Beobachtungen von Bredig bei 116° schmolz.

Die Bildung linksdrehenden Benzaldehyds mit Hilfe von Rechtsweinsäure, die Überführung des Linksbenzaldehyds in l-Mandelsäurenitril und Rechtsmandelsäure liefert den Beweis, daß auch einfache Carbonylverbindungen der Theorie entsprechend durch asymmetrische Moleküle beeinflußt, optische Aktivität annehmen können, aus denen dann bei der Addition einfacher Moleküle, z. B. HCN, eine Verbindung mit asymmetrischem Kohlenstoff direkt in aktiver Form gebildet wird.

Auch dieser asymmetrischen Synthese geht also die Aktivierung der ungesättigten Verbindung durch asymmetrische Induktion voraus.

Hiernach kann es kaum zweifelhaft sein, daß auch das von Rosenthaler benutzte Emulsin und die von Bredig verwendeten Alkaloide vor der Blausäureaddition aktivierend auf den Benzaldehyd eingewirkt haben.

Da das Benzaldehydmolekül nach der erweiterten Theorie nicht in relativ isomeren, sondern nur in zwei spiegelbildlichen Modifikationen existieren kann, die nach Satz 2[1]) gleiche Reaktionsgeschwindigkeit besitzen müssen, so kann es sich bei der asymmetrischen Synthese des Mandelsäurenitrils nicht um eine durch das Enzym oder das Alkaloid oder durch die Weinsäure bewirkte Reaktionsbeschleunigung zugunsten der Bildung eines Überschusses der einen Komponente des Mandelsäurenitrils handeln, sondern der aktivierte Benzaldehyd, der die eine aktive Komponente des Benzaldehyds bereits im Überschuß enthält, reagiert in bezug auf alle seine Moleküle gleich schnell mit der Blausäure, der vorhandene Überschuß an Linksbenzaldehyd muß aber naturgemäß auch die Bildung eines Überschusses von l-Mandelsäurenitril zur Folge haben.

Eine andere Frage aber ist es, ob die Blausäureaddition an das Gemisch der gleich rasch reagierenden spiegelbildlichen Benzaldehydmoleküle durch Anwesenheit des Emulsins oder der Alkaloide in ihrem Gesamtverlauf beschleunigt wird. Nach den Angaben von Rosenthaler und Bredig muß man dies annehmen, eine selektive Beschleunigung der Reaktion zugunsten einer der spiegelbildlichen Komponenten des Benzaldehyds ist aber nach dem Gesagten ausgeschlossen.

In anderen Fällen dagegen, bei denen der Verlauf bestimmter Reaktionen von Körpern mit mehreren asymmetrischen Gruppen durch die Wirkung eines organischen Enzyms eine Beschleunigung erfährt, hat man sich vorzustellen, daß das asymmetrisch gebaute organische Enzym durch die von ihm ausgehende asymmetrische Induktion den Körper mit mehreren asymmetrischen Gruppen zuerst in eine andere labilere und energiereichere, relativ isomere Konfiguration umwandelt, die dieser Veränderung des Moleküls entsprechend eine veränderte, sei es größere oder geringere Reaktionsgeschwindigkeit besitzen muß, als sie das Molekül in seiner ursprünglichen Konfiguration besessen hat.

Eine bei enzymatischen Vorgängen zu beobachtende Differenzierung in der Reaktionsgeschwindigkeit läßt sich also ganz ungezwungen auf die Veränderung der relativen Konfiguration

[1]) Diese Zeitschr. 52, 440.

des in Reaktion tretenden asymmetrischen Moleküls durch die von dem asymmetrischen Enzym ausgehende asymmetrische Induktion zurückführen.

Das asymmetrische Enzym braucht daher nicht notwendigerweise die Reaktionsgeschwindigkeit des ursprünglichen Körpers zu beschleunigen. Seine Wirkung kann vielmehr in der Umwandlung des ursprünglich vorhandenen Körpers in eine andere, rascher reagierende oder in eine unter den gegebenen Bedingungen allein reagierende, relativ isomere Konfiguration bestehen.

Da man von der chemischen Natur der organischen Enzyme noch gar nichts weiß, so läßt sich naturgemäß auch noch keine allgemeine und endgültige Erklärung für ihre eigentümliche Wirkungsweise geben.

Da es aber kaum zweifelhaft ist, daß die organischen Enzyme aus komplizierten, molekular asymmetrischen Molekülen bestehen, und zwar in ihrer energiereichsten, relativ isomeren Konfiguration, so wird man wohl die Wirkung der Enzyme auf asymmetrische Substanzen zum Teil auf die von ihnen ausgehende asymmetrische Induktion zurückführen müssen.

Von diesem Gesichtspunkte aus wird es vor allem wichtig sein, organische Enzyme auf ihren asymmetrischen Charakter zu prüfen.

Auch in allen anderen bisher bekannt gewordenen Fällen, bei denen aus racemischen Verbindungen durch verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit der beiden Antipoden der eine derselben in optisch aktiver Form erhalten werden konnte, hat man anzunehmen, daß die verschiedene Reaktionsgeschwindigkeit des einen Antipoden bei der Einwirkung des optisch aktiven Körpers erst die Folge einer durch asymmetrische Induktion bewirkten veränderten relativ isomeren Konfiguration ist.

Experimenteller Teil.

Gemeinsam mit F. Landsberger und G. Hilgendorff.

Versuch 1.

10 g Benzaldehyd wurden mit 15 g d-Weinsäure vermischt in absoluten Alkohol gelöst, so daß das Volumen 110 ccm betrug.

Sogleich nach der Lösung drehte die Lösung im 2-dcm-Rohr $\alpha = +0{,}93^{0}$.

Nach 4stündigem Erhitzen $\alpha = +0{,}75^0$
„ 8 „ „ $\alpha = +1{,}05^0$
„ 12 „ „ $\alpha = +1{,}05^0$

55 cm, d. i. die Hälfte der Lösung, wurden mit viel Wasser versetzt und der sich ölig abscheidende Benzaldehyd ausgeäthert. Die ätherische Lösung ein paarmal mit Wasser gewaschen und auf 50 ccm aufgefüllt, drehte in 2-dcm-Rohr:

$$\alpha = -0{,}31^0.$$

Rechnet man c ungefähr $= 10$, so berechnet sich

$$[\alpha]_D = -1{,}6^0.$$

Der zu dem Versuch angewandte Benzaldehyd war in ätherischer Lösung inaktiv.

Zu der anderen Hälfte der alkoholischen Lösung wurde unter Eiskühlung und Umschütteln tropfenweise eine konzentrierte Lösung von 3,06 g Cyankalium (96 %) zulaufen gelassen. Dabei schied sich ein dicker, weißer Niederschlag von Weinstein ab. Nach einiger Zeit wurde das fünffache Volumen Wasser zugesetzt und das entstandene Mandelsäurenitril ausgeäthert. Die nach dem Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Flüssigkeit besaß den charakteristischen Geruch des Mandelsäurenitrils und zeigte bei der Polarisation Linksdrehung $\alpha = -0{,}45^0$.

Das aktive Nitril wurde nun mit dem vierfachen Volumen konz. Salzsäure auf dem Wasserbad verseift. Die sich beim Erkalten abscheidende Mandelsäure wurde abgesaugt, getrocknet und aus Benzol umkrystallisiert.

3 g in 15 ccm Alkohol gelöst waren inaktiv, dagegen erwies sich die Benzolmutterlauge deutlich rechtsdrehend, der beobachtete Winkel α betrug $+0{,}16^0$.

Bei weiterem Einengen der Benzollösung schieden sich prächtige, meist asymmetrisch ausgebildete Krystalle ab, die bei 116° schmolzen, also genau wie das von Bredig erhaltene Präparat schwach aktiver Mandelsäure.

Die geringe Menge Krystalle 0,16 g wurden in 13 ccm Alkohol gelöst, $c = 1{,}2$ und gedreht.

Im Mittel abgelesen $\alpha = +0{,}13^0$, d. i. $[\alpha]_D = +5^0$.

Das Präparat wurde zusammen mit einem bei einem späteren Versuche gewonnenen, etwas schwächer drehenden

Präparat von d-Mandelsäure vereinigt, nochmals aus Benzol krystallisiert und verbrannt.

0,1374 g gaben 0,3186 CO_2 und 0,0668 H_2O.

Ber. f. $C_8H_8O_3$	Gef.
C 63,15	63,23
H 5,26	5,47.

Versuch 2.

14 g Benzaldehyd und 20 g d-Weinsäure wurden in 180 ccm absolutem Alkohol gelöst.

Anfangsdrehung $\alpha = +0,89^0$,

Nach 8stündigem Erhitzen $\alpha = +0,75^0$,

„ 16 „ „ $\alpha = +0,75^0$.

Die Hälfte der Lösung auf Benzaldehyd verarbeitet lieferte eine ätherische Benzaldehydlösung von $c = 14$, die im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0,47^0$ drehte, entsprechend

$$[\alpha]_D = -1,6^0.$$

Das aus der anderen Hälfte dargestellte Mandelsäurenitril drehte in ätherischer Lösung, 8 g Nitril in 13 ccm Äther, d. i. $c = 61,5$ im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0,99^0$, d. i.

$$[\alpha]_D = -0,8^0.$$

Die durch Verseifung daraus gewonnene Mandelsäure wurde aus Benzol fraktioniert.

Die erste Krystallisation war wieder inaktiv, während die letzte Krystallisation in alkoholischer Lösung ein $[\alpha]_D = +1,4^0$ zeigte.

Versuch 3.

Mengenverhältnisse von Benzaldehyd, d-Weinsäure und Alkohol wie bei Versuch 2.

Anfangsdrehung $\alpha = +0,82^0$.

Nach 6stündigem Erhitzen $\alpha = +0,94^0$,

„ 12 „ „ $\alpha = +1,20^0$,

„ 15 „ „ $\alpha = +1,20^0$.

Benzaldehyd daraus 3,5 g in 20 ccm Äther, $c = 17,5$, drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0,55^0$, d. i. $[\alpha]_D = -1,6^0$.

Das wie bei den anderen Versuchen erhaltene Nitril, 8 g in 13 ccm Äther, $c = 61,5$, drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -1,00^0$, d. i. $[\alpha]_D = -0,8^0$.

Versuch 4.

30 g Benzaldehyd und 42 g d-Weinsäure gaben nach 24stündigem Erhitzen ein Nitril, das ohne Verdünnung im 2-dcm-Rohr $\alpha = -1{,}75^0$ drehte, entsprechend $[\alpha]_D = -0{,}87^0$.

Die letzte Krystallisation der daraus gewonnenen Mandelsäure aus Benzol drehte, 0,4 g in 13 ccm Äther, $c = 3$, im 2-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = +0{,}07^0$, d. i. $[\alpha]_D = +1{,}1^0$.

Versuch 5.

8,6 g Benzaldehyd und 12 g d-Weinsäure in absolutem Alkohol — Vol. 80 ccm — drehten im 1-dcm-Rohr $\alpha = +0{,}49^0$. Nach 3stündigem Kochen $\alpha = +0{,}42^0$.

Nach weiterem 3stündigen Kochen $\alpha = +0{,}73^0$,
„ „ 7 „ „ $\alpha = +0{,}74^0$.

Die daraus gewonnene ätherische Lösung des Benzaldehyds — Vol. 110 ccm — drehte im 2-dcm-Rohr im Mittel $\alpha = -0{,}26^0$, d. i. $[\alpha]_D = -1{,}7^0$.

Das aus diesem Benzaldehyd in der gewöhnlichen Weise mit HCl und CNK dargestellte Nitril drehte in ätherischer Lösung, $c = 13$, im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}12^0$, d. i. $[\alpha]_D = -0{,}9^0$.

Versuch 6.

21,2 g Benzaldehyd und 30 g d-Weinsäure im absoluten Alkohol — Vol. 200 ccm — drehten im 1-dcm-Rohr $\alpha = +0{,}47^0$. Nach 10stündigem Erhitzen $\alpha = +0{,}73^0$.

Der zehnte Teil, wie gewöhnlich auf Benzaldehyd verarbeitet und in 14% Lösung im 2-dcm-Rohr polarisiert, lieferte ein $\alpha = -0{,}58^0$, d. i. $[\alpha]_D = -2{,}07^0$.

Der übrige Teil der Benzaldhyd-Weinsäurelösung, noch 19,1 g Benzaldehyd enthaltend, wurde durch Zusatz einer konz. Lösung von 11,8 g Cyankalium in das Nitril verwandelt. Eine 7%ige Lösung des Nitrils in Äther drehte im 2-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}18^0$, d. i. $[\alpha]_D = -1{,}3^0$.

Drehungsänderung einer absolut alkoholischen d-Weinsäurelösung bei längerem Kochen.

Um zu erfahren, inwieweit die beim Kochen der alkoholischen Lösungen von Benzaldehyd und d-Weinsäure beobachteten Drehungsänderungen auf Rechnung der Weinsäure zu

setzen sind, wurde eine Lösung von 7,5 g Weinsäure im absoluten Alkohol — Vol. 50 ccm, $c = 15$ —, die im 1-dcm-Rohr: $\alpha = +0{,}60^0$, d. i. $[\alpha]_D = +4{,}0^0$ drehte, 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht und dann nach Herstellung des gleichen Volumens untersucht: $\alpha = +0{,}66^0$, d. i. $[\alpha]_D = +4{,}4^0$.

Nach 7stündigem Kochen wurde gefunden:

$$\alpha = +0{,}98^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = +6{,}5^0.$$

Nach 12stündigem Kochen:

$$\alpha = +1{,}10^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = +7{,}3^0.$$

Da nach weiterem Kochen keine weitere Erhöhung des Drehungsvermögens auftrat, wurde die alkoholische Lösung eingedampft. Der verbleibende Rückstand besaß die Eigenschaften der Metaweinsäure. Da aber auch mit der Bildung des sauren Esters der Weinsäure zu rechnen war, wurde die Hälfte des sirupösen Rückstands mit Kali versetzt und darauf mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat gab bei der Jodoformreaktion nur so geringe Mengen von Jodoform, daß man nicht annehmen kann, daß sich in nennenswerter Menge saurer Ester gebildet hat, daß die Bildung der geringen Menge Jodoform vielmehr auf eine geringe, von der sirupösen Säure zurückgehaltene Menge Alkohol zurückzuführen ist. Dementsprechend gelang es, die sirupöse Säure in Weinstein überzuführen.

Während die Weinsäure, für sich allein in alkoholischer Lösung erhitzt, eine gleichmäßige Zunahme des Drehungsvermögens um mehr als drei Grad erfährt, die wahrscheinlich durch die Bildung von Metaweinsäure bewirkt wird, zeigten die gemischten Lösungen von Weinsäure und Benzaldehyd auffallenderweise zuerst eine Abnahme der Rechtsdrehung und dann erst eine Zunahme. Es war deshalb nicht unwahrscheinlich, daß die zuerst auftretende Abnahme der Drehung bei dem Gemisch Weinsäure-Benzaldehyd auf die Bildung des linksdrehenden Benzaldehyds zurückzuführen ist.

Zur Prüfung dieser Frage wurde eine alkoholische Lösung von 15 g Weinsäure und 10,6 g Benzaldehyd — Vol. 100 ccm —, die im 1-dcm-Rohr

$$\alpha = +0{,}49^0$$

drehte, 4 Stunden gekocht. Nach dieser Zeit war die Drehung auf

$$\alpha = 0{,}43^0$$

heruntergegangen.

25 ccm dieser Lösung, wie gewöhnlich auf Benzaldehyd verarbeitet, lieferte eine ätherische Benzaldehydlösung von $c = 8{,}8$ — Vol. 30 ccm —, die im 1-dcm-Rohr $\alpha = -0{,}16^0$, d. i. $[\alpha]_D = -1{,}8^0$ drehte.

Danach hat bereits nach 4stündigem Kochen der Weinsäure-Benzaldehydlösung der Benzaldehyd die vorher nach längerem Erhitzen beobachtete Aktivität angenommen.

Die anderen 75 ccm der alkoholischen Lösung wurden nun weiter 2 Stunden gekocht.

Die gemischte Lösung drehte nach insgesamt 6stündigem Erhitzen $\alpha = +0{,}50^0$.

Aus 25 ccm dieser Lösung wurde der Benzaldehyd abgeschieden. Seine ätherische Lösung von $c = 8{,}8$ — Vol. 30 ccm — drehte im 1-dcm-Rohr

$$\alpha = 0{,}16^0, \text{ d. h. } [\alpha]_D = -1{,}8^0.$$

Die 50 ccm der gemischten Lösung wurden weitere 4 Stunden erhitzt. Die Lösung drehte nach nunmehr 10stündigem Erhitzen im 1-dcm-Rohr:

$$\alpha = +0{,}85^0.$$

Der aus 12,5 ccm der Lösung abgeschiedene Benzaldehyd drehte in ätherischer Lösung, $c = 8{,}8$ — Vol. 15 ccm —, im 1-dcm-Rohr:

$$\alpha = -0{,}16^0, \text{ d. i. } [\alpha]_D = -1{,}8^0.$$

Aus diesem Versuch ist zu schließen, daß das Zurückgehen der Drehung bei der gemischten Lösung von Benzaldehyd und Weinsäure durch die Bildung einer bestimmten Menge von Linksbenzaldehyd verursacht wird.

Nach Bildung des Linksbenzaldehyds von dem

$$[\alpha]_D = -1{,}8^0$$

tritt nach weiterem Kochen der gemischten Lösung eine weitere erhebliche Steigerung im Drehungsvermögen ein, die jedoch, wie der Versuch erkennen läßt, lediglich durch eine Veränderung des Weinsäuremoleküls bewirkt wird, da sich das Drehungsvermögen des Benzaldehyds auch nach 10stündigem Erhitzen nicht mehr weiter verändert.

Über weitere Versuche zur Verbesserung des Verfahrens, besonders zur Erzielung nach höherem Drehwerte, soll bald berichtet werden.

Schluß.

Von besonderem Interesse ist es, daß sich der Benzaldehyd durch die Weinsäure schon beim Erhitzen des Gemisches in alkoholischer Lösung partiell aktivieren läßt, und zwar in der der Weinsäure entgegengesetzten Richtung, und daß es bei dem aktiven Benzaldehyd gelingt, die erworbene Aktivität bei der Addition von Blausäure in Form von einem, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthaltenden Körper, dem Mandelsäurenitril, festzulegen, aus dem durch Verseifung entgegengesetztdrehende Mandelsäure entsteht.

Weitere orientierende Versuche haben ergeben, daß sich durchaus nicht alle optisch aktiven Substanzen zur Aktivierung von Benzaldehyd benutzen lassen.

Es wurde auch gefunden, daß sich die Zimtsäure, wenn auch nicht durch die Weinsäure, so doch mit Hilfe anderer aktiver Körper bereits durch Erhitzen in Lösung aktivieren läßt, worüber demnächst berichtet werden soll.

Nachdem es gelungen ist, Benzaldehyd zu aktivieren, wurden endlich auch Versuche eingeleitet, um zu prüfen, inwieweit andere Aldehyde und Ketone mit zwei verschiedenen Radikalen und insbesondere Säuren, wie z. B. die Benzoesäure u. a., einer Aktivierung durch Induktion fähig sind.

Die Herren Fachgenossen bitte ich, mir die ungestörte Bearbeitung dieser Frage überlassen zu wollen und ebenso die weitere Ausarbeitung der Aktivierung des Benzaldehyds und anderer aromatischer Aldehyde.

Vor allem muß die weitere Untersuchung lehren, unter welchen Bedingungen die erworbene Aktivität des Benzaldehyds bestehen bleibt und unter welchen Bedingungen sie wieder verschwindet, und ferner ob der aktivierte Benzaldehyd etwa imstande ist, zum Teil, so wie die aktive Zimtsäure, sich mit der Weinsäure zu einer leicht wieder zerfallenden Verbindung zu vereinigen.

Über den Rechnungsfaktor bei der Phosphorbestimmung nach Neumann[1]).

Von

Wolfgang Heubner.

(Aus dem Pharmakologischen Institut zu Göttingen.)

(Eingegangen am 12. Mai 1914.)

Durch eine freundliche Mitteilung der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel erhielt ich Kenntnis davon, daß im Laboratorium dieser Firma bei zahlreichen Phosphorbestimmungen nach Neumann[2]), denen solche nach anderen, gravimetrischen Methoden parallel gingen, zu kleine Werte gefunden wurden. Die Differenz betrug etwa 3,6%. Der von Neumann für die Berechnung aufgestellte Faktor ist theoretisch aus der Zusammensetzung des gelben Niederschlages von phosphormolybdänsaurem Ammon berechnet. Die Bestimmung wird bekanntlich in der Weise vorgenommen, daß dieser gelbe Niederschlag nach bestimmten Regeln erzeugt, abfiltriert und sorgfältig ausgewaschen, darauf in einer bekannten Menge Natronlauge gelöst wird, das dabei entstehende freie Ammoniak durch Kochen verjagt und die Flüssigkeit mit Säure gegen Phenolphthalein zurücktitriert wird. Dem gefundenen Alkalidefizit, das aus der Entfernung des Ammoniaks resultiert, entspricht eine ganz bestimmte Phosphormenge, die eben mit Hilfe des erwähnten Rechnungsfaktors zu ermitteln ist. Neumann gibt an, daß 1 ccm $^n/_2$-Natronlauge 1,268 mg P_2O_5 oder 0,553 mg P entspricht.

Ich habe mich bemüht, durch eine Reihe von Analysen genau bekannter Phosphatlösungen zu einem Urteil darüber zu gelangen, welche Zahl empirisch bei der Berechnung der Analysen am genauesten die angewandte Phosphormenge wieder-

[1]) Die Kosten dieser Untersuchung wurden aus einer dankenswerten Zuwendung der Jagor-Stiftung zu Berlin bestritten.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 115, 1903; 48, 32, 1905.

finden läßt. Bei der Ausführung der analytischen Methode kommt es sehr genau auf die Beachtung einer Anzahl von Regeln an; ich habe die durch v. Wendt[1]) und Gregersen[2]) empfohlenen Modifikationen der ursprünglichen Neumannschen Methode berücksichtigt. Zur Anwendung kam eine Phosphatmenge, die 5 bis 10 mg P entsprach; man bleibt dann bei der Titration mit $^n/_2$-Lauge in den Grenzen des Titrationsvolumens, die eine bequeme und doch hinreichend genaue Bestimmung gestatten, die man also bei Reihenanalysen im allgemeinen aufsuchen wird. Die Fällung erfolgte bei etwa 80° in einem Volumen von 125 ccm, in dem 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 19 g Ammoniumnitrat und 2 g Ammoniummolybdat enthalten waren. Das Ammoniumnitrat war ein Analysenpräparat von C. A. F. Kahlbaum in Berlin, die Schwefelsäure wurde auf Phosphorfreiheit geprüft. Der Niederschlag wurde mit eisgekühltem Wasser bis zum völligen Verschwinden der Schwefelsäurereaktion im Waschwasser ausgewaschen. Der auf dem Filter befindliche Anteil des Niederschlages wurde mit $^n/_2$-Lauge gelöst, das Filter darauf mit Wasser gründlich ausgewaschen, so daß die Titrationsflüssigkeit alle Reagenzien in klarer Lösung und kein Filtrierpapier enthielt. Nach Verjagen des Ammoniaks aus der alkalischen Lösung wurde zunächst mit $^n/_2$-Schwefelsäure schwach angesäuert, die Kohlensäure des Wassers durch Kochen verjagt, darauf von neuem durch Zusatz einiger Kubikzentimeter $^n/_2$-Lauge bis zur deutlichen Rotfärbung alkalisch gemacht und nun erst definitiv auf Farblosigkeit titriert.

Die Lösungen, die zur Titration dienten, waren mit aller Sorgfalt hergestellt:

Zum Einstellen diente eine Oxalsäure, die durch sorgfältiges Umkrystallisieren eines bereits sehr reinen Handelspräparats gewonnen und durch mehrstündiges Erhitzen auf 60 bis 80°, sowie darauffolgenden 9monatigen Aufenthalt im Vakuum über frischer Schwefelsäure entwässert worden war.

Von ihr wurden 5,6184 g in 250 ccm Wasser von 15° gelöst, so daß eine 0,499 normale Oxalsäurelösung entstand. Eine $^n/_2$-Lauge des Handels wurde durch mehrere sorgfältige Titrationen unter Verjagen der Kohlensäure und Benutzung von Phenolphthalein als Indicator gegen die Oxalsäure eingestellt und ergab den gleichen Titer. Ebenso wurde eine $^n/_2$-Schwefelsäure des Handels gegen die Lauge eingestellt, wobei sich

[1]) Skandinav. Arch. f. Physiol. 17, 211, 1905.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 453, 1907.

der Titer 0,501 n ergab, so daß also jeder Kubikzentimeter der Schwefelsäure 1,004 ccm der Natronlauge entsprach.

Für die Phosphorbestimmung wurde von Kahlbaum sekundäres Natriumphosphat „zur Analyse mit Garantieschein" bezogen, dieses Salz 6mal umkrystallisiert und, bevor es zur Anwendung kam, 6 Monate über Chlorcalcium im Vakuum getrocknet.

Zur Prüfung der Reinheit und gänzlichen Trockenheit des Salzes wurden 2 Proben im elektrischen Ofen bis zur Gewichtskonstanz geglüht und dadurch der Wasserverlust beim Übergang in Pyrophosphat bestimmt; die erhaltenen Werte stimmten in den Grenzen der Analysengenauigkeit mit den theoretischen überein.

Angewandt	0,2824 g	0,4823 g	theoretisch	6,34%
Gewichtsverlust gefunden	0,0192 g	0,0312 g	Gewichtsverlust gefunden	
Gewichtsverlust berechnet	0,0183 g	0,0305 g	im Mittel	6,57%

Herstellung der Lösung A.

2,7292 g des reinen trocknen Salzes wurden auf 200 ccm Wasser von 19° gelöst. Das spezifische Gewicht der Lösung wurde mit Hilfe eines Pyknometers zu 1,0136 bestimmt, woraus sich für 100 g der Lösung ein Gehalt von 0,2942 g Phosphor ergibt.

Herstellung der Lösung B.

Um auch noch die Fehlermöglichkeit auszuschalten, die eine etwaige ungenaue Eichung des Meßkolbens bieten konnte, wurde dieser mit Luft und mit der Lösung gefüllt gewogen, wobei sich die Zahlen 51,875 und 252,945 ergaben. Für das Luftvolumen, das bei der zweiten Wägung in Wegfall kam, wurden 0,123 g gerechnet, die vom Gewicht des leeren Kolbens abgezogen wurden, so daß als wahres Gewicht der Lösung der Wert von 201,19 g gefunden wurde. Darin waren aufgelöst 1,6388 g des sorgfältig gereinigten Präparates, so daß pro 100 g Lösung 0,1780 g Phosphor zu setzen waren.

Die für den Phosphorgehalt der beiden Lösungen berechneten Werte wurden nochmals dadurch kontrolliert, daß abgewogene Mengen der Lösungen im Porzellantiegel eingetrocknet und im elektrischen Ofen bis zum konstanten Gewicht des Pyrophosphats geglüht wurden. (Vgl. Tab. I u. III.)

Aus den Werten des Glührückstandes berechnet sich für Lösung A ein Phosphorgehalt von 0,2985, für Lösung B 0,1795 pro 100 g. Wie man sieht, ist der Wert für die Lösung B zuverlässiger bestimmt.

Von Lösung A wurden 10, von Lösung B 8 abgewogene Proben nach Neumann titriert und aus den gefundenen (korrigierten) Werten. für $^n/_2$-Natronlauge die Anzahl Milligramm Phosphor berechnet, die 1 ccm der Lauge entsprechen. Die erhaltenen Werte finden sich auf Tab. II u. IV aufgezeichnet; sie schwanken bei Lösung A zwischen 0,568 und 0,589, bei Lösung B zwischen 0,569 und 0,591, falls man den aus dem Glührückstand bestimmten Phosphorgehalt als den korrekten ansieht. Dann ist also die Variationsbreite in beiden Fällen identisch, ebenso das Mittel, das sich auf 0,574 und 0,576 stellt. Legt man den Phosphorgehalt zugrunde, der sich aus der aufgelösten Menge Natriumphosphat ergibt, so ist die Abweichung etwas größer, und zwar betragen die Mittel 0,565 und 0,571. Auch hier aber ist die Abweichung von dem theoretischen Wert 0,553 außerordentlich deutlich; keine einzige der 18 Analysen erreichte ihn.

Lösung A.

Tabelle I.

1. Bestimmung des Glührückstandes.

	Angew. Lösung g	Gef. Menge $Na_4P_2O_7$ g	Phosphor %
1	9,8289	0,1257	0,298
2	16,1788	0,2071	0,299
		Mittel:	0,2985

Tabelle II.

2. Titration nach Neumann-Gregersen.

	Angew. Menge g	$^n/_2$-NaOH ccm	1 g Lösung erfordert NaOH ccm	Berechnung des Faktors auf aufgelöste Menge	Glührückstand
1	3,0403	15,97	5,25	0,560	0,569
2	3,0305	15,94	5,26	0,559	0,568
3	3,0360	15,98	5,26	0,559	0,568
4	3,0260	15,72	5,20	0,556	0,574
5	2,9817	15,16	5,08	0,579	0,588
6	3,0050	15,56	5,18	0,568	0,576
7	2,9865	15,15	5,07	0,580	0,589
8	3,0802	16,03	5,20	0,566	0,574
9	3,0451	15,98	5,25	0,560	0,569
10	3,1282	16,43	5,25	0,560	0,569
			Mittel:	0,566	0,574

Lösung B.

Tabelle III.

1. Bestimmung des Glührückstandes.

	Angew. Menge g	Gef. Menge $Na_4P_2O_7$ g	Phosphor %
1	10,4297	0,0805	0,180
2	12,0166	0,0924	0,179
		Mittel:	0,1795

Tabelle IV.

2. Titration nach Neumann-Gregersen.

	Angew. Menge g	$^n/_2$-NaOH ccm	1 g Lösung erfordert NaOH ccm	Berechnung des Faktors auf aufgelöste Menge	Glührückstand
1	5,0106	15,73	3,14	0,567	0,572
2	5,0284	15,28	3,04	0,586	0,591
3	5,0401	15,76	3,13	0,569	0,574
4	5,0571	15,87	3,14	0,567	0,572
5	3,9970	12,21	3,06	0,582	0,587
6	3,9655	12,44	3,14	0,567	0,572
7	4,0073	12,55	3,13	0,569	0,574
8	4,0196	12,68	3,16	0,563	0,569
			Mittel:	0,571	0,576

Einige weitere Versuche, bei denen eine etwas weniger sorgfältige Methodik angewandt wurde, ergaben quantitativ etwas abweichende Resultate, stimmten jedoch im Prinzip mit dem bereits geschilderten überein, insofern die pro Kubikzentimeter $^n/_2$-Natronlauge gefundene Phosphormenge größer war als 0,553.

Lösung C.

Der Phosphorgehalt wurde durch eine Anzahl gewichtsanalytischer Bestimmungen als Ammoniummagnesiumphosphat ermittelt, und zwar sowohl unter Fällung in der Kälte nach der älteren Vorschrift[1]), als auch unter Fällung in der Hitze nach B. Schmitz[2]). Daneben wurden 19 Bestimmungen nach Neumann vorgenommen, deren Ergebnis auf den Mittelwert des Phosphors bezogen wurde, wie er sich aus den Fällungsanalysen ergeben hatte. Bei einer Schwankungsbreite von 0,555 bis 0,580 ergab sich das Mittel von 0,567 mg P auf 1 ccm $^n/_2$-Natronlauge.

[1]) Vgl. Fresenius, Quantitative Analyse, 6. Aufl., Bd. I, 1903, S. 402.
[2]) Vgl. Treadwell, Analytische Chemie, 4. Aufl., Bd. II, 1907, S. 327.

Tabelle V.

1. Gravimetrische Bestimmung.

	Methode	Angew. Menge g	Gef. Menge $Mg_2P_2O_7$ g	P in 1 g Lösung mg
1	Schmitz	5,2275	0,2093	11,16
2	„	5,2235	0,2108	11,25
3	„	5,2128	0,2092	11,19
4	„	5,2336	0,2095	11,16
5	„	5,2168	0,2100	11,22
6	Fällung in der Kälte	5,2103	0,2117	11,33
7	„	5,2063	0,2113	11,31
8	„	5,2120	0,2113	11,30
9	„	5,2567	0,2113	11,20
			Mittel:	11,24

Tabelle VI.

2. Titration nach Neumann-Gregersen.

	Angew. Menge g	$^n/_2$-NaOH ccm	1 g Lösung erfordert Lauge ccm	Berechnung des Faktors auf das Mittel der gravimetrischen Analysen
1	1,0405	20,74	19,93	0,564
2	1,0381	20,35	19,60	0,573
3	1,0362	20,68	19,96	0,563
4	1,0369	20,74	20,00	0,562
5	1,0396	20,50	19,71	0,570
6	1,0453	20,89	19,99	0,562
7	1,0365	20,46	19,74	0,569
8	1,0356	20,59	19,88	0,565
9	1,0437	20,51	19,65	0,572
10	1,0400	20,41	19,63	0,573
11	1,0612	20,95	19,74	0,569
12	1,1385	22,70	19,93	0,564
13	1,0563	20,50	19,41	0,579
14	1,0466	21,02	20,08	0,560
15	1,0240	19,85	19,38	0,580
16	1,0633	21,11	19,85	0,566
17	1,0201	20,42	20,02	0,562
18	1,1080	22,47	20,27	0,555
19	1,0377	20,53	19,78	0,568
			Mittel:	0,567

Lösung D.

Ein als analysenrein geliefertes Handelspräparat von sekundärem Natriumphosphat wurde im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet, darauf in bekannter Menge auf bekanntes Volumen gelöst; das Gewicht der Lösung wurde nach Bestimmung des spezifischen Gewichts aus diesen Daten errechnet. Außerdem

wurde der Phosphorgehalt in abgewogenen Proben der Lösung gravimetrisch bestimmt. Sämtliche 8 Analysen ergaben einen wesentlich höheren Wert, als sich aus der angewandten Menge Natriumphosphat berechnet hatte, nämlich 0,3258 statt 0,3212 g pro 100 g Lösung. 15 Analysen nach Neumann gaben bei einer Variationsbreite von 0,554 bis 0,575 den Mittelwert von 0,565 mg pro Kubikzentimenter $^n/_2$-Natronlauge.

Bezogen auf den niedrigeren Phosphorwert ergibt sich allerdings 0,556; doch dürfte jener Wert bei einer Abweichung von mehr als 1% von 8 Gewichtsanalysen höchst unsicher sein.

Tabelle VII.

1. Gravimetrische Bestimmung.

	Methode	Angew. Menge g	Gef. Menge $Mg_2P_2O_7$ g	P in 1 g Lösung mg
1	Fällung in der Kälte	20,3106	0,2370	3,253
2	„	20,2855	0,2374	3,262
3	„	20,4037	0,2389	3,264
4	„	20,4558	0,2394	3,262
5	Schmitz	19,9961	0,2343	3,265
6	„	20,1402	0,2356	3,261
7	„	20,1953	0,2354	3,249
8	„	20,0465	0,2334	3,245
			Mittel:	3,258

Tabelle VIII.

2. Titration nach Neumann-Gregersen.

	Angew. Menge g	$^n/_2$-NaOH ccm	1 g Lösung erfordert Lauge ccm	Berechnung des Faktors auf angew. Menge	Berechnung des Faktors auf Mittel der gravimetrischen Bestimmungen
1	2,0796	12,16	5,85	0,549	0,557
2	2,0135	11,58	5,75	0,559	0,567
3	2,0438	11,72	5,73	0,561	0,569
4	2,0280	11,86	5,85	0,549	0,557
5	2,0273	11,67	5,76	0,558	0,566
6	2,0098	11,61	5,78	0,556	0,564
7	2,0337	11,80	5,80	0,554	0,562
8	1,9650	11,46	5,83	0,551	0,559
9	1,9996	11,77	5,88	0,546	0,554
10	2,0087	11,44	5,70	0,564	0,572
11	2,0355	11,82	5,81	0,553	0,561
12	2,0112	11,53	5,73	0,561	0,569
13	1,9859	11,25	5,67	0,567	0,575
14	2,0256	11,72	5,78	0,556	0,564
15	1,9915	11,41	5,73	0,561	0,569
			Mittel:	0,556	0,565

Aus den geschilderten Befunden möchte ich den Schluß ziehen, daß die Phosphoranalyse bei Einhaltung der von Neumann und Gregersen gegebenen Vorschriften, speziell unter den oben genauer definierten Versuchsbedingungen, korrekte Werte nur dann liefert, wenn man als Rechnungsfaktor pro Kubikzentimeter $^n/_3$-Lauge nicht den theoretischen Wert von 0,553 mg benutzt, sondern einen höheren. Mindestens gilt das für die Analyse in unseren Händen. Den Wert mit voller Sicherheit auf 3 Stellen genau anzugeben, möchte ich auf Grund meiner Versuche nicht wagen, wenn es auch sehr bemerkenswert ist, daß meine Resultate bei Lösung A und B genau übereinstimmen mit dem Ergebnis, das im Laboratorium der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel erhalten wurde: auch dort nämlich die Zahl 0,575 als brauchbarster Rechnungsfaktor. Auf jeden Fall glaube ich sagen zu dürfen, daß die Rechnung mit dem Faktor 0,57 einen der Wahrheit näher liegenden Phosphorwert liefert als mit dem Faktor 0,553; bei den nach Neumann ausgeführten Phosphoranalysen unseres Laboratoriums wird dieser Faktor von nun an benutzt.

Auffallend bleibt die Differenz zwischen diesen Befunden und denen anderer Autoren[1]), besonders Gregersens[2]), der ja gerade unter Benutzung des Faktors 0,553 zur genaueren Ausarbeitung seiner Vorschriften gelangt war und dessen Analysenergebnisse alle eine ausgezeichnete Genauigkeit und Konstanz zeigen. Ich vermag für die Abweichung meiner Zahlen keinen Grund anzugeben.

Bei der Ausführung der Analysen hat mir Fräulein Gertrud Hildenbrandt wesentliche Dienste geleistet.

[1]) Vgl. z. B. Robert Cohn, Zeitschr. f. öffentl. Chem. 1913, 58.
[2]) loco cit.

Über Bestimmung anorganischer Phosphorsäure bei Gegenwart von Phosphorsäureestern[1]).

Von

Wolfgang Heubner.

(Aus dem Pharmakologischen Institut zu Göttingen.)

(Eingegangen am 12. Mai 1914.)

Die Ausfällung anorganischer Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat erfolgt bekanntlich vorschriftsmäßig bei der Temperatur von etwa 80°. Diese Methode kann auch bei Gegenwart mancher organischer Phosphorsäureverbindungen ohne Schaden Anwendung finden; so ist es durch verschiedene Arbeiten[2]) bereits festgestellt, daß Phytinsäure unter diesen Bedingungen, d. h. bei kurzdauerndem Erhitzen auf etwa 80° nur in sehr geringem Grade hydrolysiert wird. Immerhin kann es unter Umständen erwünscht sein, auch die relativ geringe hydrolysierende Wirkung noch möglichst herabzudrücken, z. B. wenn man relativ kleine Mengen anorganischer Phosphorsäure möglichst exakt neben Phosphorsäureestern bestimmen will, oder wenn es sich um Verbindungen handelt, die vielleicht leichter hydrolysierbar sind als Phytinsäure; solche Verbindungen mögen eventuell vorkommen, auch wenn sie uns noch nicht genauer bekannt sind. Solche Gesichtspunkte waren es, die mich veranlaßten, die Ausfällung der Phosphorsäure als Ammoniumphosphormolybdat auch bei niederer Temperatur etwas genauer zu verfolgen.

---

[1]) Die Kosten dieser Untersuchung wurden aus einer dankenswerten Zuwendung der Jagor-Stiftung zu Berlin bestritten.

[2]) Besonders W. Vorbrodt, Bull. internat. de l'Acad. de Cracovie, math.-nat. Kl., Reihe A, 1910, S. 418ff. — Vgl. auch die folgende Mitteilung, S. 417/18.

Über diese Frage liegen bereits einige Angaben von Plimmer und Page vor[1]). Sie fanden bei einer Säurenormalität von 0,7 (statt 1,5 nach der Vorschrift von Gregersen) und bei Zimmertemperatur quantitative Ausfällung des Phosphors als normal konstituiertes Molybdat im Laufe von 24 bis 48 Stunden. Die Methode bewährte sich auch zur Abtrennung der anorganischen Phosphorsäure bei Gegenwart von Phytin. — Die Angaben Jegorows über die Möglichkeit, durch Molybdatfällung Phosphat neben Phytinat zu bestimmen, sind unklar und widerspruchsvoll[2]).

Tabelle I.

Ausfällung von Phosphormolybdat bei 37°.

2,9010 g Na_2HPO_4 zu 200 ccm Wasser aufgelöst; daraus berechnet: 3,12 mg P pro ccm.

6 Analysen (Bestimmung als $Mg_2P_2O_7$) ergaben im Mittel: 3,14 mg P pro ccm.

2 Bestimmungen des Glührückstands ($Na_4P_2O_7$) ergaben im Mittel: 3,15 mg P pro ccm.

Zur Berechnung diente der Wert von 0,314% Phosphor in der Lösung.

Fällung im Volumen von 125 ccm bei Gegenwart von 5 ccm H_2SO_4, 19 g NH_4NO_3, 2 g Ammoniummolybdat.

Angewandt Lösung g	Angewandt P mg	Zeit Std.	Verbraucht 1/2 n-NaOH ccm	Gefunden P mg	Gefunden zu angewandt
0,1092	0,34	1	0,6	0,3	0,90
0,6403	2,01	1	0,2	0,1	0,05
3,0228	9,49	1	2,2	1,3	0,14
0,1223	0,38	2	0,6	0,3	0,80
0,6174	1,94	2	2,8	1,6	0,83
3,0451	9,56	2	14,3	8,2	0,86
3,0468	9,57	3	15,6	8,9	0,93
0,1087	0,34	6	0,7	0,4	1,20
0,1529	0,48	6	0,9	0,5	1,04
0,6126	1,92	6	3,3	1,9	0,99
0,6284	1,97	6	3,4	1,9	0,96
3,0674	9,63	6	16,1	9,2	1,01
0,1094	0,34	24	0,2	0,1	0,40
0,1362	0,43	24	1,2	0,7	1,60
0,6118	1,92	24	3,6	2,1	1,09
3,0053	9,44	24	17,3	9,9	1,05
3,0150	9,47	24	16,8	9,6	1,01
3,0348	9,35	24	14,6	8,3	0,89

Meine Versuche erfolgten einfach in der Weise, daß Lösungen von genau bekanntem Gehalt an chemisch reinem

[1]) Biochem. Journ. 7, 163, 1913.

[2]) Vgl. diese Zeitschr. 42, 436, 1912 und 61, 51 ff., 1914.

Natriumphosphat (Na_2HPO_4) hergestellt wurden und davon abgemessene oder abgewogene Proben mit dem bekannten Reaktionsgemisch versetzt und bei 37° verschieden lange Zeit gehalten wurden; darauf wurde der entstandene Niederschlag von Phosphormolybdat abfiltriert, was stets sehr ausgezeichnet gelang, da der Niederschlag auf diese Weise relativ grob krystallinisch wird, und der ausgewaschene Niederschlag nach der Methode von Neumann auf Phosphor titriert. Die Resultate ergeben sich aus der Tabelle I. Die Zahlen zeigen, daß auf diese Weise bei mindestens 6stündiger Einwirkung der Temperatur von 37° mit durchaus hinreichender Genauigkeit die Bestimmung der Phosphorsäure erfolgen kann, und zwar innerhalb der praktisch in Betracht kommenden Grenzen von Bruchteilen eines Milligramms bis zu Zentigrammen.

In Tabelle II sind ein paar Zahlen zusammengestellt, die bei Anwendung des doppelten Volumens (250 ccm) unter sonst gleichbleibenden Mischungsverhältnissen und der Temperatur von 30° nach 1 Stunde erhalten wurden; auch diese Anordnung bewährt sich im Prinzip, nur ist offenbar die Zeit für die Abscheidung größerer Phosphormengen noch nicht ausreichend.

Tabelle II.

Ausfällung bei 30°.

0,9427 g analysenreines, wasserfreies Na_2HPO_4 in 10 ccm Wasser gelöst, ein Teil der Lösung noch auf das 5fache und 25fache verdünnt. Von jeder Lösung 1 ccm vermischt mit 250 ccm Reaktionsgemisch aus 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 38 g Ammoniumnitrat, 4 g Ammoniummolybdat und Wasser.

Angewandt P mg	Verbraucht $^1/_2$ n-NaOH ccm	Gefunden P mg	Gefunden zu angewandt
20,6	31,8	18,1	0,88
4,1	6,6	3,8	0,92
0,8	1,4	0,8	1,00

Tabelle III zeigt, daß bei Einwirken des Reaktionsgemisches bei höherer Temperatur während längerer Zeit die Resultate der Neumann-Titration falsch, und zwar zu hoch werden. Die ausgefällte Phosphormenge entspricht jedoch der angewendeten, wie sich durch Umfällen des Niederschlags erweisen läßt (vgl. 5., 6. und 8. Kolumne der Tabelle III).

Tabelle III.

Ausfällung bei 85°.

Gleiche Lösung wie in Tab. I (0,314% P als Orthophosphat).

Die Proben wurden mit dem üblichen Reaktionsgemisch 96 Stunden auf dem Wasserbad gehalten; die Bestimmung ergab zu hohe Werte, daher wurde die neutral titrierte Flüssigkeit mit 20 ccm konzentrierter Salpetersäure, 37,5 g Ammoniumnitrat, etwas Molybdat und Wasser auf 80° gebracht, kräftig geschüttelt und darauf abgekühlt; die Titration dieses zweiten Niederschlags ergab korrektere Werte.

Angewandt		I. Titration		II. Titration		P gefunden zu angewandt	
		verbraucht	gefunden	verbraucht	gefunden		
Lösung	P	1/2 n-NaOH	P	1/2 n-NaOH	P		
g	mg	ccm	mg	ccm	mg	I	II
2,1213	6,66	17,6	10,0	13,5	7,7	1,50	1,15
2,0404	6,41	15,7	9,0	11,5	6,6	1,40	1,02

Zusatz von Inosit beeinflußt die Bestimmung der Phosphorsäure nicht wesentlich, wenn auch die Resultate etwas unregelmäßiger zu werden scheinen (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV.

Phosphat und Inosit bei 37°.

Gleiche Phosphatlösung wie vorher mit Inosit versetzt, darauf mit Reaktionsgemisch (125 ccm) verschieden lange Zeit im Thermostaten gelassen; Niederschlag wie immer nach Neumann titriert.

Angewandt			Zeit	Verbraucht	Gefunden	P gefunden zu angewandt
Phosphatlösung	P	Inosit		1/2 n-NaOH	P	
g	mg	mg	Std.	ccm	mg	
0,6118	1,92	2,0	1	0,45	0,26	0,14
3,0145	9,47	10,0	1	2,9	1,7	0,18
0,1205	0,38	0,6	2	0,7	0,4	1,05
0,6338	1,99	2,0	2	2,8	1,6	0,80
2,9879	9,38	10,0	2	14,3	8,2	0,87
0,1136	0,36	0,6	6	0,8	0,5	1,27
0,6137	1,93	2,0	6	3,6	2,1	1,06
3,0605	9,61	10,0	6	17,3	9,9	1,03

In der gleichen Weise wurden nun auch Versuche angestellt, wo außer der Phosporsäure auch organische Phosphorverbindungen, und zwar Natriumglycerinphosphat und Natriumphytinat in die Lösung gebracht wurden. Beim Phytinat mußte der in dem Präparat von vornherein gegenwärtige anorganische Phosphor natürlich berücksichtigt werden (vgl. folgende Mitteilung S. 416). Das Glycerinphosphat enthielt keine in Betracht kommenden Mengen anorganischen Phosphats, wie folgende Analysen zeigen:

Natriumglycerinphosphat.

Präparat von E. Merck bezogen, enthielt ungetrocknet 10,06% P. 1,0223 g zu 50 ccm gelöst; je 5 ccm (= 10,3 mg P) der Lösung mit Reaktionsgemisch bei 37° gehalten. Minimaler Niederschlag nach Neumann titriert.

Zeit Stunden	Verbraucht $^1/_2$ n-NaOH ccm	Gefunden P mg	P gefunden zu angewandt
48	0,26	0,15	0,01
120	0,19	0,11	

Tabelle V.

Gemisch von Phosphat und Glycerinphosphat bei 37° gefällt.

Phosphatlösung: 0,5201 Na_2HPO_4 auf 100 ccm in Wasser gelöst (= 0,1135% P).

Glycerinphosphatlösung: 2,5013 des ungetrockneten Präparats auf 100 ccm in Wasser gelöst (= 0,258% P).

Je 18,0 ccm der Glycerinphosphatlösung (= 46,4 mg P) mit wechselnden Mengen Phosphatlösung vermischt, nach Zusatz von Reaktionsgemisch (Volumen 125 ccm) 6 Stunden bei 37° gehalten, Niederschlag auf P titriert.

Angewandt		Verbraucht $^1/_2$ n-NaOH	Gefunden P	P gefunden zu Phosphat-P
Phosphatlösung ccm	Phosphat-Phosphor mg	ccm	mg	
2,2	2,5	4,0	2,3	0,92
4,4	5,0	8,0	4,6	0,92
6,6	7,5	12,0	6,8	0,91
9,8	11,1	17,5	10,0	0,90

Die Resultate der Analysen in den Gemischen zeigen die Tabellen V und VI, sowie Versuch 7. Es ergibt sich als Gesamtresultat, daß die Werte fast stets etwas zu niedrig ausfallen, so daß man nur 90% des wirklichen Wertes erhält. Dies ist der Fall bei einem Überschuß von Glycerinphosphat-Phosphor um das 4 bis 20 fache, von Phytinphosphor um das Doppelte des anorganischen Phosphors; bei 3 bis 6 fachem Überschuß des Phytinphosphors entsprechen die erhaltenen Werte sogar nur etwa 75% des vorhandenen Phosphats, bei noch größerem Überschuß werden sie unbrauchbar. Doch kommt es ohne Zweifel nicht nur auf das Verhältnis, sondern auch auf die absolute Phytinkonzentration an, wie der Vergleich von Tabelle VI mit Versuch 7 lehrt. Besonders deutlich wird der Einfluß des Phytinphosphors bei einer Menge von

mehr als 50 mg im Volumen von 125 ccm (mehr als 0,04% Phytinphosphor im Fällungsgemisch). Diese Resultate in den gemischten Lösungen erklären auch, warum die Werte für die Bestimmung des im Phytin von vornherein vorhandenen anorganischen Phosphors bei Anwendung wachsender absoluter Mengen von Phytin immer niedriger werden (vgl. Tabelle I der folgenden Mitteilung, S. 414).

Tabelle VI.

Gemisch von Phosphat und Phytinat bei 37° gefällt.

Für Analyse 1 bis 7:

Phosphatlösung wie vorher (Tabelle V).

Phytinlösung: 2,8574 g lufttrockenes Natriumphytinat auf 200 ccm in Wasser gelöst (= 0,274% P, davon 0,254% organisch).

Für Analyse 8 bis 12:

Phosphatlösung: 0,5004 g Na_2HPO_4 auf 100 ccm in Wasser gelöst (= 0,109% P).

Phytinlösung: 2,0012 g lufttrockenes Natriumphytinat auf 100 ccm in Wasser gelöst (= 0,384% P, davon 0,356% organisch).

Gemische behandelt wie vorher (vgl. Tabelle V).

	Angewandt		Angewandt		Verbraucht	Gefunden	% P gefunden zu Phosphat-P
	Phytinlösung	Phytin-P korrig.	Phosphatlösung	Phosphat-P korrig.	1/2 n-NaOH	P	
	ccm	mg	ccm	mg	ccm	mg	
1.	9,0	22,9	2,2	4,3	5,6	3,2	0,74
2.	9,0	22,9	4,4	6,8	7,6	4,3	0,63
3.	9,0	22,9	6,6	9,3	12,5	7,1	0,76
4.	9,0	22,9	8,8	11,8	20,2	11,5	0,97
5.	9,0	22,9	11,0	14,3	21,7	12,4	0,87
6.	18,0	45,7	6,6	11,1	15,2	8,7	0,78
7.	18,0	45,7	11,0	16,1	21,3	12,1	0,75
8.	2,7	9,6	4,5	5,7	9,0	5,1	0,90
9.	6,7	23,9	4,5	6,8	9,8	5,6	0,82
10.	13,4	47,7	4,5	8,7	11,4	6,5	0,75
11.	20,1	71,6	4,5	10,5	10,9	6,2	0,59
12.	26,8	95,5	4,5	12,4	8,5	4,9	0,40

Versuch 7.

0,1045 g lufttrockenes Natriumphytinat wurde mit 10 ccm konz. Schwefelsäure, 38 g Ammonnitrat und 4 g Ammonmolybdat im Volumen von 250 ccm 30 Stunden auf 37° gehalten. Danach Niederschlag abfiltriert, nach Neumann titriert: 2,6 ccm 1/2 NaOH = 1,5 mg P (1,4%). Filtrat (ohne Waschwasser) in 5 Portionen geteilt (überall 3,7 mg Phytin-Phosphor), zu Portion I und II je 0,05, zu III und IV je 0,25 ccm einer Lösung von 0,494 g Na_2HPO_4 in 25 ccm Wasser gegeben: also in

I und II je 0,22, in III und IV je 1,08 mg anorgan. Phosphor. Portion II, IV und V (ohne Zusatz) 16 Stunden in den Eisschrank (10°), Portion I und III ebensolange in den Thermostaten (37°) gebracht. Danach:

Portion	V	10°	0	anorgan. P	völlig wasserklar.
„	II		0,2 mg	„	sehr geringer, doch deutlicher gelber Niederschlag.
„	IV		1,1 „	„	gelber Beschlag mit makroskopisch sichtbaren Kryställchen.
„	I	37°	0,2 „	„	gelber Beschlag, stärker als in IV.
„	III		1,1 „	„	derbe, krystallinische gelbe Kruste an der Gefäßwand.

Niederschlag in III ausgewaschen, nach Neumann titriert:

1,8 ccm $^1/_2$ n-NaOH
= 1,03 mg P gefunden
1,08 „ P angewandt.

Vielleicht hängen diese Differenzen zwischen erwarteten und erhaltenen Werten mit der kürzlich von Jegorow[1]) beobachteten Erscheinung zusammen, daß der gelbe Phosphormolybdatniederschlag nach seiner Entstehung bei Phytingegenwart wenige Prozent eines organischen Phosphorsäurekomplexes enthalten kann. Damit würde eine abnorme Zusammensetzung des Niederschlags nahe gelegt, die wohl auch auf das Verhältnis der anorganischen Phosphorsäure zum Ammoniak übergreifen könnte; auf die Konstanz dieses Verhältnisses aber gründet sich ja die Neumannsche Titrationsmethode. Mit Hilfe einmaliger Umfällung — die ich systematisch nicht durchgeprüft habe — wird sich vielleicht die Molybdatmethode soweit verbessern lassen, daß sie auch trotz anfänglicher Phytingegenwart völlig exakte Werte liefert.

Es schien mir schließlich noch von Interesse, bei den hier benutzten Versuchsbedingungen die Zersetzlichkeit einer kondensierten Phosphorsäure zu prüfen. Ich stellte mir daher Natriumpyrophosphat her, das durch die Analyse als rein erwiesen wurde, und ließ abgemessene Mengen davon in dem mehrfach genannten Reaktionsgemisch verschieden lange Zeit bei 37° stehen. Tabelle VIII gibt die Übersicht, aus der hervorgeht, daß die Zersetzung der Pyrophosphorsäure in merklichem Grade relativ schnell einsetzt, gleichmäßig fortgeht und frühestens

[1]) Diese Zeitschr. 61, 52, 1914.

nach 2 Tagen einen solchen Grad erreicht, daß der gesamte Phosphor in Form von Orthophosphorsäure vorliegt.

Tabelle VIII.

Pyrophosphat; $Na_4P_2O_7$.

Analysenreines Na_2HPO_4 vor dem Gebläse bis zur Gewichtskonstanz geglüht.

Vom Rückstand 1,5016 g auf 100 ccm in Wasser gelöst (0,350% P), 2 ccm der Lösung wurden 20 Minuten mit ca. 10%iger Schwefelsäure gekocht, danach P nach Neumann bestimmt:

verbraucht 12,45 ccm $^1/_2$ n-NaOH = 7,1 mg P gefunden,
7,0 „ „ berechnet.

Je 2 ccm der Lösung mit Reaktionsgemisch versetzt, verschieden lange Zeit bei 37° gehalten, ausgefallenes Phosphormolybdat nach Neumann titriert; in Parallelproben unter Zusatz von je 7,1 mg Inosit.

Zeit in Stunden	Verbraucht $^1/_2$ n-NaOH ccm	Gefunden P mg	Mit Inosit: verbraucht $^1/_2$ n-NaOH ccm	Mit Inosit: gefunden P mg	P gefunden zu angewandt ohne Inosit	P gefunden zu angewandt mit Inosit
2	1,5	0,8	1,2	0,7	0,11	0,10
4	2,7	1,5	2,4	1,4	0,21	0,20
6	3,4	2,0	3,6	2,1	0,29	0,30
10	6,0	3,4	5,9	3,4	0,49	0,49
14	9,4	5,3	9,1	5,2	0,76	0,74
20	10,2	5,8	11,2	6,4	0,83	0,91
48	11,9	6,8	11,7	6,7	0,97	0,96
100	12,9	7,4	12,5	7,2	1,06	1,03

Bei der Ausführung der Analysen hat mir Frl. Gertrud Hildenbrandt wesentliche Dienste geleistet.

Zusammenfassung.

Anorganische Phosphorsäure wird bei Gegenwart von 4 Volumprozent konzentrierter Schwefelsäure und 15% Ammoniumnitrat binnen 6 Stunden bei 37° als phosphormolybdänsaures Ammon von normaler Zusammensetzung quantitativ ausgefällt. Gegenwart geringerer Konzentrationen von Phytin ändert daran nichts, während wachsende Phytinmengen die Ausfällung stören. Bis zu einem 6fachen Überschuß an Phytinphosphor und einer Konzentration an diesem von etwa 0,05% erhält man jedoch bei einmaliger Ausfällung und Titration des anorganischen Phosphors nach Neumann nicht weniger als $^3/_4$ der vorhandenen Menge. Glycerinphosphorsäure wirkt weniger störend als Phytin.

Einige Beobachtungen über Phytin[1]).

Von

Wolfgang Heubner.

(Aus dem Pharmakologischen Institut zu Göttingen.)

(Eingegangen am 12. Mai 1914.)

In einer früheren, gemeinsam mit M. Reeb angestellten Untersuchung[2]) habe ich eine Reihe von Zahlen für die Verteilung des Phosphors in verschiedenen Nahrungsmitteln angegeben. Jene Analysen sollten zunächst nur einen vorläufigen Überblick ermöglichen, daher war die von uns verwendete Methode nicht darauf angelegt, die verschiedenen Fraktionen des Phosphors analytisch in völlig exakter Weise aufzuteilen; sie litt jedoch außerdem an einem prinzipiellen Mangel, weil sie nicht in gebührender Weise die Tatsache berücksichtigte, daß „wasserlösliche Ester" der Phosphorsäure in Pflanzenteilen reichlich als unlösliche Salze vorhanden sind. Diese wurden also bei unserer Extraktion mit heißem Wasser nur teilweise extrahiert und infolgedessen im Rückstand mitbestimmt und in der Fraktion „Nuclein- und Phosphoreiweiß" mitberechnet. Besonders gilt dies zweifellos für unsere Analyse der Kleie, deren Hauptphosphormenge nach den uns damals noch nicht bekannten Bestimmungen von Suzuki und Yoshimura[3]) in Form von Phytin vorhanden ist.

Dieser von uns begangene Fehler veranlaßte mich, die Eigenschaften des Phytins, soweit sie analytisch in Betracht kommen, ein wenig eingehender zu studieren. Speziell handelt es sich um die Bestimmung des Phytins neben gleichzeitig vorhandener anorganischer Phosphorsäure. Denn nur im Gemisch mit dieser erhält man Phytinsäure in Pflanzenextrakten, auch spaltet sie bekanntlich selbst ziemlich leicht anorganische Phosphorsäure ab.

[1]) Die Kosten dieser Untersuchung wurden aus einer dankenswerten Zuwendung der Jagor-Stiftung zu Berlin bestritten.

[2]) Schmiedeberg-Festschrift, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1908, S. 265.

[3]) Bull. coll. agric., Tokio, 7, 495, 1907.

Die Literatur über Phytinsäure — deren Calciummagnesiumsalz als „Phytin“ im Handel ist — ist bereits recht umfangreich, wie ja aus dem Interesse, das die Verbindung bietet, genügend erklärlich ist. Die vorliegenden Angaben sind jedoch keineswegs völlig widerspruchslos und die Substanz bietet daher noch manche Probleme, auf die hier jedoch nicht eingegangen werden soll. Ich beschränkte mich ausschließlich mit der Untersuchung einiger Präparate, die mir durch die „Gesellschaft für chemische Industrie in Basel“ in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt wurden. Es waren eine Lösung von freier Phytinsäure und zwei Salze in Form trockener Pulver, und zwar ein Barium-Phytinat und ein Natriumphytinat. Bei weitem die meisten Versuche stellte ich mit dem Natriumphytinat an, das ein hellgraues krystallinisches Pulver darstellte.

Einige Analysen über die Zusammensetzung der genannten Präparate finden sich im folgenden wiedergegeben. Zu bemerken wäre dazu noch, daß das Natriumphytinat seinen Wassergehalt im Vakuum über Schwefelsäure nur außerordentlich langsam hergab. So wurden aus einer Probe nach mehrwöchentlichem Stehen im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur nachträglich durch eintägiges Erhitzen auf 110° ohne Vakuum noch 1,3% Wasser vertrieben. — Zur Bestimmung des Natriums wurden abgewogene Mengen des Präparates mit Säuregemisch verascht, die Lösung mit Ammoniumcarbonat neutralisiert, die Phosphorsäure durch Eisenchlorid gefällt, der Niederschlag abfiltriert und heiß mit ammonacetathaltigem Wasser ausgewaschen, das Filtrat auf dem Wasserbad in einer Platinschale eingetrocknet, der Rückstand zum Glühen erhitzt, dann noch mit Wasser aufgenommen und quantitativ in einen Platintiegel hineinfiltriert, in dem mit reinem Ammoniumcarbonat bis zur Gewichtskonstanz geglüht wurde. In einem Falle wurde auch nochmals in Wasser gelöst, da eine Spur Eisenoxyd noch immer vorhanden schien.

Lösung reiner Phytinsäure.

Zusatz von Molybdat bei Gegenwart von Säure und Ammoniumnitrat erzeugte keinen Niederschlag (Zimmertemperatur).

Zusatz von Magnesiamixtur gab einen gallertigen Niederschlag.

Analysen auf Phosphor nach Neumann:

angewandt	verbraucht $^1/_2$ n-NOH	P	
1,0 ccm	18,0 ccm	10,3 mg	1,00% im Mittel
1,0 „	16,9 „	9,6 „	

Bestimmung des Trockenrückstands:

	angewandt	Rückstand	
auf dem Wasserbad: . .	2,0 ccm	0,0852 g	4,26%
	2,0 „	0,0754 g	3,77%
im Vakuum über H_2SO_4:	4,0 „	0,1595 g	3,99%

P in der trockenen Phytinsäure: . **25,0%**
berechnet für $C_6H_{18}O_{24}P_6 + 4\,H_2O$: 25,4%
„ „ $C_6H_{18}O_{24}P_6 + 3\,H_2O$: 26,1%
Analysen früherer Autoren . . . . 25,9 bis 27,1%.

Bariumphytinat.

0,3762 g des lufttrocknen Pulvers gelöst auf 100 ccm 0,6%iger Salzsäure.

Davon 40 ccm mit Schwefel-Salpetersäure verascht, das ausfallende Bariumsulfat quantitativ abfiltriert, gewaschen, geglüht, im eingeengten Filtrat vorschriftsmäßige Phosphorbestimmung nach Neumann.

Gef. $BaSO_4$: 0,0849 g = 0,0500 g Ba 33,2% 0,365 Millimol
verbr. $^1/_2$ n-NaOH: 29,6 ccm = 0,0169 g P 11,2% 0,545 „

Auf 6 Atome P: 4,02 Atome Ba.

Natriumphytinat.

Bestimmung der Trockensubstanz.

Lufttrockenes Pulver bei 110° verschieden lange getrocknet.

Angewandt g	Zeit Tage	Gewichtsverlust g	H_2O %
0,3433	1	0,0239	6,97
0,3541	1	0,0246	6,95
0,5658	2	0,0384	6,79
1,3242	2	0,0903	6,82
0,3816	1	0,0256	6,72
	2	0,0260	6,83
	7	0,0265	6,95
1,4552	1	0,0986	6,77
	2	0,1001	6,88
	7	0,1017	6,99
	15	0,1045	7,18

rund 7% Feuchtigkeit.

Bestimmung des Natriums.

Vom lufttrockenen		Gefunden Na_2SO_4	
Präparat angewandt:	0,8948	0,5304	Na = 19,2%
Vom lufttrockenen			
Präparat angewandt:	0,9129	0,5296	Na = 18,8%

Mittel 19% Na = 0,823 Mol in 100 g.

Bestimmung des Phosphors.

Lufttrockenes Präparat verascht, P nach Neumann und durch Fällung mit Magnesiamixtur bestimmt.

Angewandt g	Verbraucht ccm 1/2 n-NaOH	Gefunden P mg	% P	Mittel
0,0515	17,4	9,9	19,2	
0,1502	51,3	29,2	19,5	
0,0472	15,7	9,0	19,0	
0,0491	16,6	9,5	19,4	19,27
0,0477	16,0	9,1	19,1	
0,0501	17,1	9,7	19,4	
	Gefunden $Mg_4P_2O_7$			
0,2035	0,1389	38,4	18,9	
0,2280	0,1571	43,8	19,2	19,13
0,2066	0,1434	40,0	19,3	

Gesamtmittel = 19,2% P = 0,618 Mol in 100 g.

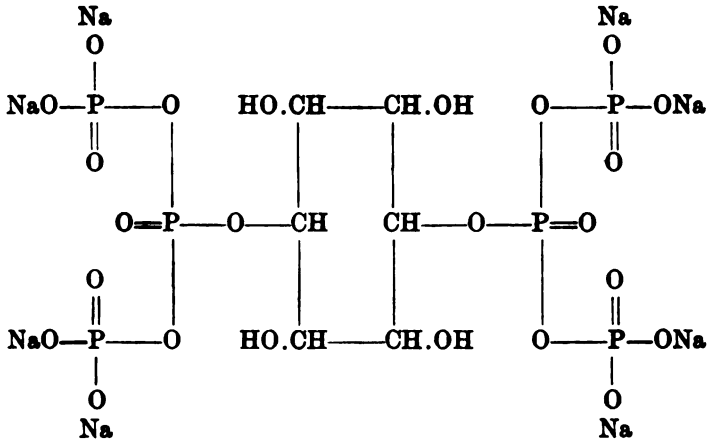
Auf 6 Atome P: 7,99 Atome Na.

In der Trockensubstanz	20,6% P;	20,4% Na,
berechnet für $C_6H_{10}Na_8O_{24}P_6 + 4\,H_2O$	20,5% P;	20,3% Na.

Bei Betrachtung der erhaltenen Zahlen fällt es auf, daß sowohl das Barium- wie das Natriumsalz auf 6 Atome Phosphor genau 8 Valenzen durch das Metall abgesättigt haben; bei diesen Berechnungen ist vorausgesetzt, daß die in dem Präparat von Natriumphytinat (und Bariumphytinat?) vorhandene anorganische Phosphorsäure erst durch Spaltung von Phytin bei der Präparation entstanden ist, so daß sich die entsprechenden Inositmengen ganz oder mindestens teilweise ebenfalls darin finden. Aber auch unter Berücksichtigung des bei Natriumphytinat gefundenen 1,4% anorganischen Phosphors in Form von Na_2HPO_4 ergibt die Berechnung keine wesentliche Verschiebung: 7,72 Atome Na auf 6 Atome P. Dies scheint mir die Forderung nahezulegen, bei der Aufstellung einer Formel für die Phytinsäure 8 Hydroxylgruppen des Moleküls in völlig symmetrischer Stellung anzusetzen.

Dies ist bei den meisten bisher angenommenen Formeln des Phytins nicht recht möglich, doch würde sich diese Schwierigkeit leicht lösen, wenn man je drei Phosphorsäurereste zu einer Gruppe zusammenfaßte, die durch das mittlere Phosphorsäureradikal an Inosit gebunden ist,

während die zwei endständigen nur an Phosphorsäure haften. (Vgl. schematisches Formelbild.)



$C_6H_{10}Na_8O_{24}P_6$

Zugunsten einer solchen Formel, in der eine komplexe Phosphorsäure nur mit zwei Kohlenstoffatomen des Inositkerns in Beziehung tritt, ließen sich auch noch die Feststellungen von R. J. Anderson[1]) anführen, der bei Behandeln von Inosit mit 6 Molekülen Orthophosphorsäure einen Tetra-phosphorsäureester, bei Behandeln mit 3 Molekülen Pyrophosphorsäure aber einen Di-pyrophosphorsäureester erhielt.

Die frischen Lösungen der Präparate zeigten beim Versetzen mit den für die Fällung anorganischer Phosphorsäure günstigen Mengen von Säure, Ammoniumnitrat, Ammoniummolybdat bei Zimmertemperatur keine Spur eines Niederschlags. Nach mehrtägigem Stehen einer Lösung von Natriumphytinat ließ sich auf gleiche Weise ein eben sichtbarer minimaler gelber Hauch von Phosphorammoniummolybdat erzeugen. In einem Fall wurde der auf diese Weise erhaltene Niederschlag aus 0,1015 Natriumphytinat nach 7 tägigem Stehen mit der Reaktionsflüssigkeit abfiltriert, der Phosphorgehalt darin nach Neumann bestimmt; er stellte sich auf 0,6 mg.

Unter Verwertung von Erfahrungen, die ich selbst, sowie andere Autoren über die Fällung von anorganischer Phosphorsäure bei niederer Temperatur gewonnen hatten[2]), wurde die Menge von anorganischem Phosphat bestimmt, die dem von mir verwendeten Präparat von Natriumphytinat beigemischt war.

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 11, 471; 12, 97, 1912.

[2]) Vgl. die vorhergehende Mitteilung S. 402 ff.

Tabelle I.

Natriumphytin mit Reaktionsgemisch bei 37° behandelt.

Herstellung der verwendeten Lösungen:

1. 1,4962 g lufttr. Substanz zu 44,8297 g gelöst.
2. 0,3965 „ „ „ „ 13,4969 „ „
3. 2,0030 „ „ „ „ 21,8953 „ „
4. 1,8570 „ „ „ „ 100 ccm „
5. 5,1498 „ „ „ „ 100 „ „
6. 0,9919 „ „ „ „ 500 „ „

	Zeit in Std.	Angew. Menge Lösung	Phytin-natrium mg	Phos-phor mg	n/2-NaOH ccm	Gefunden Phosphor mg	Gefunden zu Gesamt-Phosphor %
1	2	0,979 g	32,7	6,3	0	0	0
2	2	2 ccm	37,1	7,1	0,4	0,2	3,2
3	2	2 „	37,1	7,1	1,0	0,6	7,9
4	$2^1/_2$	50 „	99,2	19,0	1,1	0,6	3,3
5	$3^1/_3$	1,053 g	96,4	18,5	0,5	0,3	1,6
6	$3^1/_3$	1,055 „	96,5	18,5	0,3	0,2	0,9
7	4	2 ccm	37,1	7,1	0,5	0,3	3,7
8	4	2 „	37,1	7,1	0,5	0,3	4,1
9	5	50 „	99,2	19,0	1,2	0,7	3,6
10	6	3,20 „	53,3	10,2	0,6	0,3	3,1
11	6	3,20 „	53,3	10,2	0,7	0,4	4,1
12	6	5 „	80,2	15,4	1,2	0,7	4,6
13	6	8,05 „	134,2	25,8	1,4	0,8	3,1
14	6	8,05 „	134,2	25,8	1,6	0,9	3,5
15	6	13,40 „	214,9	41,3	2,6	1,5	3,5
16	6	16,10 „	268,4	51,5	2,2	1,3	2,4
17	6	16,10 „	268,4	51,5	2,3	1,3	2,6
18	6	24,15 „	402,6	77,3	3,7	2,1	2,7
19	6	24,15 „	402,6	77,3	3,9	2,2	2,9
20	6	33,45 „	536,6	103,0	2,2	1,2	1,2
21	6	33,45 „	536,6	103,0	4,1	2,3	2,3
22	6	39,00 „	650,1	124,8	1,5	0,8	0,7
23	6	39,00 „	650,1	124,8	2,1	1,2	1,0
24	8	0,950 g	31,7	6,1	0,2	0,1	2,1
25	8	2 ccm	37,1	7,1	0,6	0,3	4,5
26	8	2 „	37,1	7,1	0,6	0,3	4,8
27	8	1,073 g	98,2	18,8	0,6	0,4	1,9
28	8	1,085 „	99,2	19,1	0,3	0,1	0,7
29	8	50 ccm	99,2	19,0	2,1	1,2	6,3
30	16	1,011 g	29,7	5,7	0,9	0,5	8,8
31	16	0,892 „	29,8	5,7	0,5	0,3	5,4
32	16	1,032 „	30,3	5,8	0,8	0,4	7,6
33	16	2 ccm	37,1	7,1	0,8	0,4	6,0
34	16	2 „	37,1	7,1	1,0	0,6	8,0

Tabelle I (Fortsetzung).

	Zeit in Std.	Angew. Menge Lösung	Phytin-natrium mg	Phos-phor mg	n/2-NaOH ccm	Gefunden Phosphor mg	Gefunden zu Gesamt-Phosphor %
35	24	1,050 g	30,9	5,9	0,5	0,3	4,7
36	24	1,181 „	34,7	6,7	0,7	0,4	6,2
37	24	1,051 „	96,2	18,5	1,3	0,7	3,8
38	24	1,053 „	96,4	18,5	1,3	0,7	4,0
39	24	15 ccm	772,5	148,3	11,4	6,5	4,4
40	24	15 „	772,5	148,3	12,2	7,0	4,7
41	30	50 „	99,2	19,0	2,4	1,4	7,2
42	32	1,000 g	33,4	6,4	0,8	0,5	7,3
43	32	2 ccm	37,1	7,1	0,8	0,5	6,6
44	32	2 „	37,1	7,1	0,8	0,5	6,6
45	48	1,023 g	30,0	5,8	0,8	0,4	7,6
46	48	1,081 „	98,9	19,0	1,9	1,1	5,6
47	48	1,084 „	99,1	19,0	1,3	0,8	4,0
48	50	50 ccm	99,2	19,0	2,4	1,4	7,2
49	64	1,004 g	29,5	5,7	0,9	0,5	8,8
50	64	1,041 „	30,6	5,9	0,9	0,5	8,7
51	64	2 ccm	37,1	7,1	0,9	0,5	7,6
52	64	2 ccm	37,1	7,1	1,1	0,6	8,6
53	64	1,154 g	38,5	7,4	1,3	0,7	9,6
54	96	1,090 „	99,7	19,1	2,4	1,4	7,3
55	96	1,118 „	102,3	19,6	2,7	1,6	7,9
56	100	50 ccm	99,2	19,0	3,2	1,8	9,6
57	128	2 „	37,1	7,1	1,2	0,7	9,5
58	128	2 „	37,1	7,1	1,3	0,7	10,1
59	142	0,912 g	30,4	5,9	1,5	0,8	14,2
60	192	1,077 „	98,5	18,9	3,8	2,2	11,5
61	192	1,097 „	100,4	19,3	3,9	2,2	11,6
62	497	2 ccm	37,1	7,1	2,8	1,6	22,6
63	497	2 „	37,1	7,1	2,9	1,7	23,3

Tabelle II.

Mittelzahlen aus Tabelle I.

Stunden	Analysennummern aus Tabelle I.	P %
2	1. 2. 3	3,4
4	7. 8	3,9
8	24. 25. 26	3,8
16	30. 31. 32. 33. 34	7,2
24	35. 36	5,4
32	42. 43. 44	6,8
64	49. 50. 51. 52. 53	8,7
128	57. 58	9,8
497	62. 63	22,9

Zu dem Zwecke wurden bekannte Mengen des Phytinsalzes in eine Lösung gebracht, die pro 125 ccm enthielt: 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 19 g Ammoniumnitrat und je nachdem 2 bis 6 g Ammoniummolybdat. Die Mischung wurde verschieden lange Zeit im Thermostaten bei 37° stehen gelassen, danach das auskrystallisierte Phosphormolybdat abfiltriert, ausgewaschen und nach Neumann titriert. Die Resultate sind in Tabelle I verzeichnet. In der kleinen Tabelle II sind für verschiedene Zeiten die gefundenen Resultate noch einmal für sich aufgezeichnet, so daß die Funktion der Zeit gut zu erkennen ist; es sind solche Analysen ausgewählt, bei denen der Phosphorgehalt einigermaßen gleich war. Aus der Gesamtheit der Zahlen ergibt sich, daß als vorgebildete anorganische Phosphorsäure in dem Natriumphytinat etwa soviel angenommen werden kann, wie rund 7% des gesamten vorhandenen Phosphors entspricht (= 1,35% P im Ausgangsmaterial). Der Gehalt an Phytinphosphor in dem lufttrockenen Natriumphytinat kann also ohne wesentlichen Fehler zu 17,8% angenommen werden.

Am sichersten erhält man den wahren Wert für den anorganischen Phosphor, wenn man sich die entsprechenden Zahlen kurvenmäßig nach der Zeit aufträgt. Man sieht dann, daß die Kurve in den späteren Tagen nur sehr langsam ansteigt, dagegen in den ersten etwa 6 Stunden schneller. Verfolgt man also den langsam ansteigenden Kurvenschenkel nach rückwärts, so trifft er nicht den Nullpunkt, sondern oberhalb des Nullpunktes die Ordinate, und zwar eben in der Höhe, die der vorgebildeten anorganischen Phosphorsäure entspricht.

Der langsame Anstieg der Kurve ist natürlich der Ausdruck für die allmähliche Zersetzung des Phytins, die allmähliche Abspaltung anorganischer Phosphorsäure in saurem Milieu bei 37°. Diese Abspaltung geht außerordentlich langsam vor sich und erreicht im Laufe von 5 Tagen nur etwa 3% des ursprünglich vorhandenen (organischen) Phytinphosphors.

Setzt man Versuche in ganz gleicher Weise an, nur daß an Stelle einer Temperatur von 37° Wasserbadtemperatur (also etwa 85°) gewählt wird, so zeigt sich, daß eine wesentlich schnellere Zersetzung des Phytins erfolgt. Tabelle III gibt darüber Auskunft. Die für den Phosphor darin enthaltenen Zahlen sind allerdings inkorrekt, was durch die abnorme Zusammensetzung des unter diesen Bedingungen ausfallenden Phosphormolybdats begründet ist (vgl. vorige Mitteilung Tab. III, S. 404), doch genügen die Zahlen zu einem Überblick über die Abspaltung des anorganischen Phosphors aus Phytinsäure. Zweifellos wird

im Laufe einiger Tage die gesamte im Phytin vorhandene Phosphormenge in Form anorganischer Phosphorsäure frei.

Tabelle III.

Natriumphytin mit Reaktionsgemisch bei 85° behandelt.

	Zeit Std.	Angew. Menge Lösung g	Phytinnatrium mg	Phosphor mg	$^n/_2$-NaOH ccm	Gef. Phosphor mg	Phosphor %
1	2	1,013	33,8	6,5	3,6	2,1	31,6
2	8	0,881	29,4	5,6	5,6	3,2	56,6
3	16	0,988	29,0	5,6	6,8	3,9	69,6
4	16	0,921	30,7	5,9	9,6	5,4	92,2
5	16	1,086	31,9	6,1	7,5	4,3	69,4
6	24	1,045	30,7	5,9	9,3	5,3	89,6
7	24	1,036	30,4	5,8	8,5	4,9	83,2
8	24	1,023	47,2	9,1	13,0	7,4	81,7
9	24	1,028	47,4	9,1	14,9	8,5	93,2
10	$26^1/_2$	0,978	32,6	6,3	10,2	5,8	93,0
11	96	1,015	46,8	9,0	25,0	14,2	157,8
12	96	1,024	47,3	9,1	23,0	13,1	144,3

R. H. A. Plimmer hat schon früher angegeben, daß Phytin bei 37° durch Säure nicht (muß heißen: wenig) angegriffen wird, bei 65 und 75° jedoch langsam hydrolysiert wird[1]).

Tabelle I zeigt übrigens noch mit voller Deutlichkeit eine andere Erscheinung: mit zunehmender Konzentration des Phytins wird auch bei gleichdauernder Einwirkung von Temperatur und Reagens die Menge des niedergeschlagenen Phosphors relativ zu der vorhandenen Phosphormenge geringer. Dies ist bereits ein Hinweis darauf, daß die Menge des ausfallenden anorganischen Phosphors um so weniger der tatsächlich vorhandenen Phosphatmenge entspricht, je mehr Phytin gleichzeitig in Lösung ist[2]).

Aus dieser Tatsache folgt, daß der oben gefundene Wert von ca. 1,35 % anorganischen Phosphors im lufttrockenen Natriumphytinat nur als approximativ angesehen werden kann und Angabe einer völlig scharfen Zahl keinen Sinn haben würde.

Wurde dagegen in einer frischen Lösung von Natriumphytinat der Phosphorgehalt auf die gewöhnliche Weise bestimmt, indem zu der sauren nitrathaltigen Flüssigkeit nach raschem Erhitzen auf etwa 80° Molybdat zugefügt, dann bald danach nach Abkühlen abfiltriert und titriert wurde, so

[1]) Biochem. Journ. 7, 79, 1913.

[2]) Vgl. auch die vorige Mitteilung S. 401.

ergab sich die gleiche Menge Phosphor, wie durch Fällung bei 37° gefunden wurde:

Angewandt Natriumphytinat	P	Verbraucht $^n/_2$-NaOH	Gefunden P	Gefunden: Angewandt P
37,1 mg	7,1 mg	0,9 ccm	0,5 mg	7%

Über die Spaltung des Phytins unter dem Einfluß von Alkali und von Säure liegen schon eine ganze Reihe Angaben vor; daher habe ich selbst nur wenige Versuche in dieser Richtung unternommen.

Die Versuche mit Säurespaltung wurden in der Weise ausgeführt, daß in wässeriger Lösung oder auch in Ammoniumnitrat Phytin mit einer geeigneten Menge Schwefelsäure zusammengebracht, verschieden lange Zeit zum Sieden erhitzt und danach unter Ergänzung der Lösung durch Zusatz von Ammoniumnitrat und Molybdat und Auffüllung auf das gehörige Volumen die vorhandene anorganische Phosphorsäure bei etwa 80° ausgefällt und nach Neumann bestimmt wurde. Wie aus Tabelle IV hervorgeht, wurde auch nach 6stündigem

Tabelle IV.

Spaltung von Natriumphytinat in saurer Lösung.

Zu Versuch 1 bis 6 diente eine Lösung von 1,857 g Phytinat auf 100 ccm.

Konzentration H_2SO_4 Vol.-%	Zeitdauer des Erhitzens Minuten	Angewandt Phytinnatrium mg	Angewandt P mg	Verbraucht $^n/_2$-NaOH ccm	Gefunden P mg	Vom angewandten P %
8	5	37,1	7,1	0,8	0,5	7,0
8	10	37,1	7,1	1,0	0,6	8,5
8	30	37,1	7,1	1,0	0,6	8,5
8	40	37,1	7,1	1,2	0,7	9,9
8	60	37,1	7,1	1,4	0,8	11,3
8	360	37,1	7,1	4,1	2,3	32,4
5	120	105,0	20,2	6,8	3,9	19,2

Kochen mit 14,5%iger Schwefelsäure doch nicht mehr als etwa 30% des Phosphors in anorganischer Form abgespalten. (Auch hier ließ sich durch Aufzeichnen einer Kurve zeigen, daß von vornherein eine Menge anorganischer Phosphorsäure vorhanden sein mußte, die etwa 1,35% Phosphor im Ausgangspräparat entsprach.) Bei dem Sieden mit Lauge wurde in gleicher Weise verfahren, nur daß die alkalische Lösung mit Schwefelsäure genau neutralisiert, dann auf ein bestimmtes

Volumen mit Wasser verdünnt wurde, und nun erst weitere Mengen konzentrierter Schwefelsäure, Nitratlösung und Molybdatlösung zugesetzt wurden, um die anorganische Phosphorsäure vorschriftsmäßig zu fällen. Die Resultate ergeben sich aus Tabelle V.

Tabelle V.

Spaltung von Natriumphytinat in alkalischer Lösung.

Konzentration NaOH	Dauer des Erhitzens	Angewandtes Phytinnatrium	Angewandt P	Verbraucht $^n/_2$-NaOH	Gefunden P	Vom angewandten P
%	Minuten	mg	mg	ccm	mg	%
10	60	38,2	7,8	1,7	1,0	13,7
2	120	765,2	146,9	12,8	7,3	5,0

Nach M. A. Jegorow[1]) spaltet bereits Kochen mit Wasser bei Atmosphärendruck im Laufe von 16 Stunden die gesamte Phosphorsäure des Phytins ab. Die Angabe verdient wohl der Nachprüfung.

Bei Eisschranktemperatur geht die Spaltung des Phytins ganz außerordentlich langsam; man kann in dem saurem Gemisch, in dem Nitrat und Molybdat zur Fällung vorhanden sind, eine Phytinlösung mehrere Tage lang im Eisschrank aufbewahren, ohne daß der gelbe Niederschlag entsteht oder sich merklich vermehrt.

Dagegen übt außer der höheren Temperatur auch das Licht einen deutlich fördernden Einfluß auf die Spaltung des Phytins in saurer Lösung. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß die schon mehrmals erwähnte fertige Mischung zur Ausfällung der anorganischen Phosphorsäure mit einer Phytinlösung zusammengebracht und zunächst einige Stunden bei 37° gehalten wurde, daraufhin das von der anorganischen Phosphorsäure befreite Filtrat in 2 Portionen geteilt und unter verschiedenen Bedingungen beobachtet wurde. Als Indicator diente immer das Auftreten und die Menge des charakteristischen gelben Phosphormolybdatniederschlages. Ein Unterschied der Temperatur, der bei der Einwirkung direkten Sonnenlichtes störend sein konnte, wurde entweder dadurch ausgeschaltet, daß das Kontrollschälchen gleichlange Zeit bei 37° gehalten wurde, oder dadurch, daß in flachen Schälchen die eine Probe

[1]) Diese Zeitschr. 42, 438/39, 1912.

mit einer weißen, die andere mit einer gelbbraunen Glasscheibe bedeckt wurde; es wurde kontrolliert, daß die Temperatur in beiden Fällen gleich war, während doch die an dem gelben Niederschlag erkennbare Umsetzung unter der Einwirkung des weißen Lichtes deutlich stärker war. Auch im diffusen Tageslicht war bei genügender Zeitdauer der Unterschied völlig sicher erkennbar.

Für die analytische Trennung von Phytinsäure von anorganischer Phosphorsäure ist das Eisensalz besonders wichtig, wie mir durch die Gesellschaft für chemische Industrie in Basel freundlichst mitgeteilt wurde, wie übrigens auch aus den Mitteilungen von Posternak[1]) ersichtlich ist. Denn bei schwach saurer Reaktion wird Phosphorsäure durch Eisenchlorid nicht gefällt, während Phytinsäure einen unlöslichen und nahezu quantitativen Niederschlag gibt[2]). Ich stellte daher einige Versuche über die Brauchbarkeit dieser Fällungsmethode für die analytische Trennung von Phytinsäure und Phosphorsäure an, indem ich bekannte Mengen einer Phytinsäure- und Phosphorsäurelösung zusammenmischte, mit Eisenchlorid zur Ausfällung brachte und durch Filtration zu trennen suchte; im Filterrückstand wie im Filtrat wurde der Phosphor nach Neumann bestimmt. Einige dieser Ergebnisse finden sich in Tabelle VI

Tabelle VI.

Fällung von Phytinsäure durch Eisenchlorid bei schwach salzsaurer Reaktion.

Angewandt				Verbraucht $^1/_5$ n-NaOH		P gefunden		P gefunden zu angewandtem		
Natrium-phytinat mg	Natrium-phosphat mg	Phytin-P mg	Phosphat-P mg	Niederschlag ccm	Filtrat ccm	Niederschlag mg	Filtrat mg	Phytin %	Phosphat %	in Summa %
123,7	18,3	23,7	4,0	46,6	2,0	26,6	1,1	112	28	100
72,8	49,4	14,0	10,8	37,5	6,1	21,4	3,5	153	32	100
49,5	7,3	9,5	1,6	17,0	3,2	9,7	1,8	102	112	104

zusammengestellt. Es ergibt sich daraus, daß man mit dieser Fällungsmethode wohl unter Umständen einigermaßen brauchbare Resultate erhalten kann, daß aber die Methode unzuver-

[1]) Compt. rend. de l'Acad. **137**, 203, 1903.

[2]) Vgl. darüber Näheres in der folgenden Mitteilung.

lässig ist und zur allgemeinen Anwendung deshalb nicht zu brauchen. Die Hauptschwierigkeit liegt offenbar in der colloidalen Natur des Eisenphytinats, das anorganische Phosphorsäure adsorbiert, die unter Umständen sehr schwer auszuwaschen ist.

Bei der Ausführung der meisten Analysen hat mir Frl. Gertrud Hildenbrandt wesentliche Dienste geleistet; bei den letztgenannten Versuchen erfreute ich mich der Hilfe von Frl. Helene Böker, jetzigen Frau Prof. Loeb.

Zusammenfassung.

Phytinsäure wird in einer 1,5 normalen Säurekonzentration bei 37° nur sehr allmählich gespalten, pro Tag noch nicht zu 1% der vorhandenen Menge (bei ca. 0,005% Phytinphosphor in der Lösung: 0,7% tägliche Spaltung).

Das Licht beschleunigt deutlich die Spaltung des Phytins durch Säure.

Über eine Titrationsmethode zur Bestimmung des Phytins[1]).

Von

Wolfgang Heubner und Hermann Stadler.

(Aus dem Pharmakologischen Institut zu Göttingen.)

(Eingegangen am 12. Mai 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Da die Trennung des Phytins von sonstigen Phosphorsäureverbindungen mit Hilfe der einfachen Ausfällung des Eisenchlorids nicht gelang[2]), so wandten wir uns zur Ausarbeitung einer Titrationsmethode, indem wir ein bei der „Gesellschaft für chemische Industrie" in Basel geübtes Verfahren zum Ausgangspunkt nahmen, von dem wir durch freundliche Mitteilung der genannten Firma Kenntnis erhielten. Zu unserer Untersuchung diente vor allem das Natriumphytinat, das von der gleichen Firma geliefert war, und über dessen Eigenschaften in der vorhergehenden Abhandlung Näheres mitgeteilt ist[3]). Außer der Lösung des reinen Präparates kamen auch Gemische von diesem mit Natriumphosphat zur Anwendung, was natürlich auch ein Studium des Verhaltens dieses anorganischen Salzes zu Eisenchlorid zur Voraussetzung hatte.

Phosphorsäure sowohl wie Phytinsäure geben in Lösung ihrer neutralen Salze eine Fällung mit Eisenchlorid, die natürlich proportional der vorhandenen Menge Phosphor- oder Phytinsäure ist. Das Eisen wird dabei im Niederschlag gebunden, so daß in der Lösung keine Eisenionen vorhanden sind. Setzt man der Lösung also einen Indicator zu, z. B. Rhodanammonium,

[1]) Die Kosten dieser Untersuchungen wurden aus einer dankenswerten Zuwendung der Jagor-Stiftung zu Berlin bestritten.

[2]) Vgl. vorhergehende Mitteilung S. 420.

[3]) S. 411.

so wird dieser erst dann die Gegenwart von Eisen in der Lösung nachweisen, wenn so viel Eisenchloridlösung zugeflossen ist, als der vorhandenen Menge Phosphat oder Phytinat entspricht.

Die Eisenverbindung der Phytinsäure ist gallertartig und besitzt Elfenbeinfarbe. Ferrocyankalium und Schwefelammonium zersetzen sie.

Ferriphosphat so gut wie Ferriphytinat sind nun aber beide keine Verbindungen, in der die Salzkomponenten mit besonders starker Affinität aneinander gebunden wären. In einigermaßen höherer Konzentration von Salzsäure bleibt sowohl beim Phosphat wie beim Phytinat die Fällung durch Eisenchlorid aus. Doch auch schon durch schwächere Agenzien kann das Gleichgewicht zwischen Phytinsäure und Ferriionen verschoben werden; das gilt bereits von dem als Indicator zu verwendenden Rhodanammonium. Auf Tabelle I finden sich

Tabelle I.

Neutrale Phytinlösung bei wechselnder Rhodankonzentration.

Phytinlösung: 3,8227 lufttrocknes Natriumphytinat auf 50 ccm in Wasser gelöst (= 1,084% P; 1,005 korr. Phytin-P).

Rhodanlösung: Chemisch reines Ammonrhodanid $^1/_2$ Stunde bei 100° getrocknet, danach 3,805 g auf 500 ccm in Wasser gelöst (ca. $^1/_{10}$ normal, 0,76%).

Eisenlösung: Auflösung von $FeCl_3$, 20 ccm analysiert: 0,0463 Fe_2O_3 = 0,162% Fe. Ausgangsvolumen stets 100 ccm; Umschlag bei **schwacher** Rotfärbung.

Phytinlösung ccm	$^n/_{10}$-Rhodanammonlösung 0,28	1,4	3,5	7,0	35,0	
0,25	2,60	2,65	2,50	2,40	2,25	ccm Eisenlösung
0,625	—	5,75	5,40	5,20	—	
1,25	12,15	11,00	10,25	10,50	9,65	
3,12	27,40	25,70	26,30	23,80	—	
6,25	—	49,90	47,50	45,10	42,70	
0,25	1,67	1,71	1,61	1,55	1,45	mg Fe zu mg Phytin-P
0,625	—	1,48	1,39	1,34	—	
1,25	1,57	1,42	1,32	1,35	1,24	
3,12	1,41	1,33	1,36	1,23	—	
6,25	—	1,29	1,22	1,16	1,10	

wiedergegeben die Werte, die wir erhielten, als wir eine neutrale Lösung von Natriumphytinat ohne Säurezusatz bei Gegenwart verschiedener Mengen von **Rhodanammonium** mit Eisenchloridlösung titrierten. Es zeigte sich, daß mit wachsender

Konzentration an Rhodanid die gefundenen Eisenwerte geringer werden. Daher ist es auch möglich, einer bis zum Umschlagspunkt (zum schwachen Rosa) titrierten Lösung durch bloßes Zugeben von Rhodanid tief dunkelrote Farbe zu geben, die erst durch merkliche Mengen neuen Phytinats — bei konstant bleibender Eisenmenge — wieder zur Farbe des Umschlagpunktes zurückgeführt wird.

Tabelle II.

Phytinsäure bei wechselnder Säurekonzentration.

Eisenlösung: wie vorher; Rhodanlösung: überall 5 ccm auf 100 ccm Ausgangsvolumen ($^n/_{200}$).

Phytinlösung: 4,9526 g lufttrocknes Natriumphytinat auf 100 ccm in H_2O gelöst (= 0,951 % P).

23%ige HCl ccm	HCl %	Eisenchloridlösung ccm	Endvolumen ccm
0	0	8,2	108
1,0	0,23	5,5	105
2,0	0,46	5,0	105
4,0	0,92	4,1	104
6,0	1,38	2,7	103
8,0	1,84	0,6	100
10,0	2,30	0,2	100

Auf Tabelle II finden sich die Titrationswerte, die bei konstanter Konzentration an Phytin und an Rhodanammonium und wechselnder Konzentration an Säure, und zwar Salzsäure gefunden wurden; auf Tabelle III eine entsprechende

Tabelle III.

Phosphorsäure bei wechselnder Säurekonzentration.

Eisenlösung: wie vorher; Rhodanlösung: überall 0,5 ccm auf 25 ccm Ausgangsvolumen ($^n/_{500}$).

Phosphatlösung: 12,56 g lufttrockenes, krystallwasserhaltiges, analysenreines Natriumphosphat auf 100 ccm in Wasser gelöst (ca. 1 bis 1,5 % P); davon überall 1,5 ccm.

23%ige HCl ccm	HCl %	Eisenchloridlösung ccm	Endvolumen ccm
0	0	20,0	45
0,93	0,2	1,0	26
2,3	0,5	0,1	25
4,6	1,0	0,1	25

Versuchsreihe, wo statt Phytinsäure Phosphorsäure titriert wurde. Es zeigt sich, daß mit wachsender Säurekonzentration die anorganische Phosphorsäure außerordentlich rasch das Vermögen verliert, durch Ferriionen gefällt zu werden, während Phytinsäure noch bei relativ hohen Säurekonzentrationen die Fällbarkeit bewährt. Auf diesem Unterschied eben beruht die Möglichkeit, Phytinsäure mit Hilfe von Eisensalzen bei Gegenwart anorganischer Phosphorsäure zu titrieren. Das Intervall an Säurekonzentration, in dem ein wesentlicher Unterschied in dem Verhalten zwischen Phytinat und Phosphat wahrzunehmen ist, ist immerhin nicht sehr groß, wie sich am deutlichsten aus der Kurve ergibt, die auf Grund von Analysen der Tabellen II und III gezeichnet wurde. Die untere Grenze der brauchbaren Säurekonzentration liegt etwa bei 0,5 %; eine obere Grenze ist dadurch gegeben, daß bei zunehmender Konzentration an Mineralsäure die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Ferriionen und Phytinsäure langsamer und langsamer erfolgt, so daß das Ende der Titration immer schwerer zu beurteilen wird.

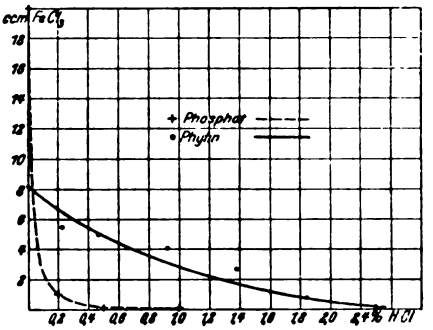


Fig. 1.

Dies macht sich bereits deutlich bemerkbar bei der Konzentration von 0,75, mehr noch bei 1,0 % HCl. Als günstigste Konzentration für die gesonderte Bestimmung von Phytinsäure und Phosphorsäure mit Hilfe der Eisenfällung ergab sich daher 0,6 %ige Salzsäure.

Der Einfluß der Säurekonzentration auf die durch Phytin gebundene Eisenmenge muß sich natürlich auch bemerkbar machen, wenn man von zunächst neutraler Lösung ausgeht. Denn die Eisenchloridlösung ist ja an sich bereits durch hydrolytisch abgespaltene Säure ziemlich stark sauer, und überdies wird durch die Reaktion mit Phytin der Säuregrad nicht vermindert, sondern sogar verstärkt. (Wie sich aus den Zahlen der Tabelle I berechnen läßt, werden im besten Falle 2 Atome

Eisen auf 3 Atome Natrium des Natriumphytinats gebunden; das bedeutet also 6 Valenzen der Eisenionen auf 3 Natriumionen. Das bei der Umsetzung freiwerdende Natrium genügt also nicht, um das gesamte bei der Umsetzung freiwerdende Chlor zu neutralisieren; nebenher muß sich Salzsäure bilden. Daraus folgt, daß mit wachsenden Mengen Phytin, die in die Reaktion eintreten, auch der Säuregrad in der Reaktionsflüssigkeit wachsen muß.) So erklärt es sich, daß mit wachsenden Phytinmengen die auf die Gewichtseinheit Phytin berechneten Mengen Eisenchlorid allmählich abnehmen. Schon aus der Tabelle I ist dies ersichtlich. In den Versuchen der Tabelle IV wurden diese Verhältnisse noch einmal zahlen-

Tabelle IV.

Einfluß der Phytinkonzentration.

Eisenlösung: wie vorher; Phytinlösung: wie Tabelle I; Anfangsvolumen 25 ccm; kein Säurezusatz.

Phytinlösung ccm	Phytin-Phosphor korrigiert mg	Eisenlösung ccm	Fe : P
0,25	2,5	2,6	1,62
0,50	5,2	4,8	1,50
1,00	10,3	9,35	1,47
1,50	15,5	13,4	1,40

mäßig festgestellt, wobei zur Ausschaltung der Wirkung des Rhodans dieses nicht der Titrationsflüssigkeit zugesetzt, sondern der Endpunkt der Titration mit Hilfe der Tüpfelmethode ermittelt wurde.

Titration des Phytins in saurer Lösung.

In den folgenden Versuchen wurde eine Eisenchloridlösung angewendet, die durch Zusatz von freier Salzsäure auf einen Überschuß an dieser von 0,6 % gebracht worden war; der zu titrierenden Lösung wurde stets $^1/_{10}$ Volumen 6 %iger Salzsäure zugesetzt, so daß sich während der Titration die Konzentration an Salzsäure nicht änderte. Unter diesen Bedingungen wurde nun die Konzentration an Rhodanid variiert und bei verschiedenen Konzentrationen die Titration wechselnder Mengen Phytins ausgeführt. Die Eisenchloridlösung wurde in Portionen zugefügt und jedesmal gewartet, bis die eintretende Rotfärbung

verschwunden war. Das Ausfallen eines weißlichen Niederschlags zeigt an, daß man sich der Titrationsgrenze nähert. Nun wurde mit Portionen von 0,25 bis 0,15 ccm weiter titriert, das Absetzen des Niederschlages abgewartet und die überstehende Schicht bei Tageslicht in der Durchsicht gegen Filterpapier betrachtet. Der Endpunkt der Titration wurde als erreicht betrachtet, wenn in der über dem Niederschlag stehenden Flüssigkeit ein blasses Rosa auftrat und mindestens 5 Minuten bestehen blieb, wie es etwa Nr. 78A bis 78B des „Code des Couleurs“ [1]) entspricht. Der Farbenton ist ähnlich dem einer gesunden menschlichen Haut. Die erhaltenen Resultate finden sich verzeichnet auf Tabelle V bis IX.

Tabelle V.

Rhodan: $^1/_{100}$ n.

Salzsaure Eisenchloridlösung:
in je 50 ccm gefunden 0,1236 g, 0,1234 g Fe_2O_3 = 0,1728% Fe;
„ „ 5 „ „ 0,1860 g, 0,1849 g AgCl = 0,61% überschüss. HCl.

Ammoniumrhodanidlösung:
eingestellt gegen je 10 ccm einer Silbernitratlösung von 1,853% Ag-Gehalt; verbraucht: 6,95, 6,90 ccm; Lösung = 0,248 normal (1,885%).

Salzsäure: durch Titration mit Silbernitrat und Rhodanid als 5,98%ig bestimmt.

Phytinlösung: 4,568 g lufttrocknes Natriumphytinat auf 200 ccm in Wasser gelöst (= 0,407% Phytinphosphor).

Überall $^1/_{10}$ Volumen 6%ige Salzsäure, $^1/_{25}$ Volumen Rhodanidlösung.

Ausgangsvolumen ccm	Phytinlösung ccm	Phytin-Phosphor mg	Verbrauchte Eisenlösung ccm	Fe mg	Fe : P	
50	0,5	2,0	0,6	1,0	0,50	
50	1,0	4,1	1,7	2,9	0,71	
50	2	8,1	3,8	6,6	0,81	
50	5	20,4	9,6	16,6	0,81	Mittel 0,81
50	10	40,7	19,1	33,0	0,81	
50	20	81,4	38,4	66,3	0,81	
50	40	162,8	77,5	134,0	0,82	
150	0,5	2,0	0,4	0,7	0,35	
148	1,0	4,1	1,3	2,2	0,54	
146	2	8,1	3,2	5,5	0,68	
140	5	20.4	8,5	14,7	0,72	Mittel 0,74
131	10	40,7	18,0	31,0	0,76	
112	20	81,4	37,0	63,9	0,79	
125	40	162,8	72,8	125,8	0,77	

[1]) P. Klincksieck und Th. Valette. — Paul Klincksieck, Paris.

Tabelle VI.

Rhodan: $^1/_{133}$ n.

Salzsaure Eisenchloridlösung:
in je 50 ccm gefunden 0,0432 g, 0,0430 g Fe_2O_3 = 0,0603% Fe;
„ „ 8 „ „ 0,2505 g, 0,2412 g AgCl = 0,66% überschüss. HCl.

6%ige Salzsäure und 0,25 n-Rhodanlösung: wie Tabelle V.

Phytinlösung: 2,0006 g lufttrocknes Natriumphytinat auf 200 ccm in Wasser gelöst (= 0,178% Phytinphosphor).

Ausgangsvolumen überall 100 ccm, darin 10 ccm Salzsäure und 8 ccm Rhodanlösung.

Phytinlösung ccm	Phytin-P mg	Verbrauchte Eisenlösung ccm	Fe mg	Fe : P	
1,0	1,8	1,65	1,0	0,56	
1,0	1,8	1,7	1,0		
2,7	4,8	5,8	3,5	0,73	
2,7	4,8	5,75	3,5		
5,4	9,6	11,45	6,9	0,72	
5,4	9,6	13,15	7,9	0,82	
10,7	19,0	25,7	15,5	0,82	Mittel
27,0	48,1	64,65	39,0	0,81	0,80
27,0	48,1	67,45	40,7	0,85	
50,0	89,0	121,9	73,5	0,83	
50,0	89,0	119,1	71,8	0,81	

Tabelle VII.

Rhodan: $^1/_{900}$ n.

Eisenlösung, Salzsäure, Rhodanlösung: wie Tabelle VI.

Phytinlösung: 2,2961 g Natriumphytinat auf 200 ccm in Wasser gelöst (= 0,204% Phytinphosphor).

Überall $^1/_{10}$ Volumen Salzsäure, $^1/_{50}$ Volumen Rhodanlösung.

Ausgangsvolumen ccm	Phytinlösung ccm	Phytin-P mg	Verbrauchte Eisenlösung ccm	Fe mg	Fe : P	Zeitpunkt der Titration nach Mischung d. Lösungen	Fe × 1,19 = P gefunden mg	P gefunden zu angewandt %
100	1	2,0	2,65	1,6	0,80	sofort	1,9	95
100	10	20,4	28,4	17,1	0,84	„	20,3	100
100	50	102,0	142,95	86,2	0,85	„	102,6	101
250	1	2,0	2,3	1,4	0,70	„	1,7	85
250	1	2,0	2,6	1,6	0,80	nach 20 Min.	1,9	95
250	2,5	5,1	6,3	3,8	0,75	sofort	4,5	88
250	2,5	5,1	5,8	3,5	0,69	nach 20 Min.	4,2	82
250	5	10,2	12,5	7,6	0,75	sofort	9,0	88
250	5	10,2	13,9	8,4	0,82	nach 20 Min.	10,0	98
250	10	20,4	27,4	16,5	0,81	sofort	19,6	96
250	10	20,4	27,6	16,6	0,81	nach 20 Min.	19,7	97
250	25	51,0	70,75	42,7	0,84	sofort	50,8	100
250	25	51,0	71,1	42,9	0,84	nach 20 Min.	51,0	100
250	50	102,0	141,4	85,3	0,84	„ 20 „	101,5	100
					Mittel: 0,80			

Tabelle VIII.

Rhodan: $^1/_{300}$ n.

Eisenchloridlösung, Salzsäure, Rhodanlösung: wie Tab. V.

Phytinlösung: 4,5674 g lufttrocknes Natriumphytinat auf 200 ccm in Wasser gelöst (= 0,407 % Phytinphosphor).

Überall $^1/_{10}$ Volumen 6 %ige Salzsäure, $^1/_{80}$ Volumen Rhodanlösung.

Ausgangsvolumen ccm	Phytinlösung ccm	Phytinphosphor mg	Verbrauchte Eisenlösung ccm	Fe mg	Fe : P	Fe × 1,19 = P gefunden mg	P gefunden zu angewandt %
50	0,5	2,0	0,9	1,6	0,80	1,9	95
150	0,5	2,0	0,8	1,4	0,70	1,7	85
50	1,0	4,1	1,9	3,2	0,78	3,8	93
150	1,0	4,1	1,9	3,2	0,78	3,8	93
50	2,0	8,1	3,8	6,5	0,80	7,7	95
150	2,0	8,1	3,8	6,5	0,80	7,7	95
50	4,0	16,3	7,8	13,5	0,83	16,1	99
150	4,0	16,3	7,6	13,1	0,80	15,6	96
50	8,0	32,6	15,4	26,6	0,82	31,7	97
150	8,0	32,6	15,2	26,2	0,80	31,2	96
50	16,0	65,1	31,2	53,9	0,83	64,1	98
150	16,0	65,1	30,7	53,1	0,82	63,2	97
					Mittel: 0,80		

Tabelle IX.

Rhodan: $^1/_{300}$ n.

Eisenchloridlösung, Salzsäure, Rhodanlösung: wie Tab. V.

Phytinlösung: wie Tabelle VIII.

Überall $^1/_{10}$ Volumen 6 %ige Salzsäure, $^1/_{75}$ Volumen Rhodanlösung.

Ausgangsvolumen ccm	Phytinlösung ccm	Phytinphosphor mg	Verbrauchte Eisenlösung ccm	Fe mg	Fe : P	Fe × 1,19 = P gefunden mg	P gefunden zu angewandt %
50	0,5	2,0	1,0	1,7	0,85	2,0	100
150	0,5	2,0	1,1	1,8	0,90	2,1	105
50	1,0	4,1	1,9	3,3	0,80	3,9	95
150	1,0	4,1	2,0	3,4	0,83	4,0	98
50	2,0	8,1	3,9	6,7	0,83	8,0	99
150	2,0	8,1	4,0	6,9	0,85	8,2	101
50	4,0	16,3	7,8	13,5	0,83	16,1	99
150	4,0	16,3	8,2	14,1	0,87	16,8	103
50	8,0	32,6	15,6	27,0	0,83	32,1	99
150	8,0	32,6	15,4	26,6	0,82	31,7	97
50	16,0	65,1	31,7	54,7	0,84	65,1	100
150	16,0	65,1	31,6	54,6	0,84	65,0	100
					Mittel: 0,84		

Außer der Phytin- und Rhodankonzentration wurde noch das Volumen variiert, in einer Versuchsreihe (vgl. Tabelle V) auch in der Weise, daß am Ende der Titration das Volumen gleich war. Diese Modifikation schien jedoch von geringerer Bedeutung zu sein, während das absolute Volumen zu Beginn der Titration sich ein wenig geltend machte, falls die Rhodankonzentration noch relativ hoch war ($^1/_{100}$ n, vgl. Tabelle V); dann wurde bei geringerem Volumen und gegebenem Gehalt an Phytin, also bei höherer Phytinkonzentration, relativ mehr Eisen gefunden als bei größerer Verdünnung. — Offenbar beruht dies auf dem Wettstreit zwischen Phytin und Rhodan, da die Änderungen der Acidität bei dem großen Überschuß freier Salzsäure nicht ins Gewicht fallen. — Als praktisch erwies sich das Volumen von 100 ccm am Beginn der Titration.

Die Konzentration der Eisenlösung scheint ebenfalls relativ gleichgültig zu sein; wenigstens fanden wir zwischen einem Eisengehalt von 0,06 und 0,17% keinen sinnfälligen Unterschied.

Für die Rhodankonzentration ist es aus dem oben angeführten Grund erwünscht, sie möglichst niedrig zu halten. Jedoch ist für den praktischen Zweck eine untere Grenze dadurch gegeben, daß bei allzu geringer Konzentration die Färbung des Eisenrhodanids außerordentlich schwach wird und auch relativ langsam — erst im Laufe von Minuten — in Erscheinung tritt. Dies ist natürlich für die Titration unbequem. Als die Konzentration, die nach beiden Richtungen hin das Wünschenswerte leistet, erwies sich schließlich die $^1/_{250}$ normale, also etwa 0,03%, Rhodanammonium.

In einigen Versuchen wurde Pyrophosphatlösung in der gleichen Weise wie Phytin bei saurer Reaktion mit Eisenchlorid behandelt. Es stellte sich heraus, daß Pyrophosphat ebenfalls Eisen bindet, und soweit es nach einigen tastenden Versuchen zu beurteilen war, ungefähr in gleicher Menge wie Phytin (auf den Phosphorgehalt berechnet). Der Übergang der farblosen Lösung in die gefärbte erfolgt jedoch so außerordentlich langsam, daß ein scharfer Endpunkt mit Sicherheit nicht zu bestimmen war.

Titration des Phytins bei Phosphatgegenwart.

Nach diesen Ermittelungen wurde nun die Titration des Phytins mit Eisen auch bei Gegenwart verschiedener Mengen von Phosphat vorgenommen. Schwierigkeiten zeigten sich bei der Ausführung der Titration im allgemeinen nicht, ausgenommen die Fälle, wo in relativ kleinem Volumen große Mengen anorganischen Phosphors vorhanden waren. Dann war nämlich der Umschlag wesentlich schwerer zu erkennen; die

Farbänderung erfolgte nicht von farblos nach einer rötlichen Lachsfarbe hin, sondern es war vor dem Auftreten rötlicher Nuancen eine Zone blaßgelber Töne eingeschaltet. Mit voller Sicherheit ließ sich also hier der Endpunkt der Titration kaum ermitteln.

Tabelle X.

Gemische von Phytinat und Phosphat mit Eisenchlorid titriert.

Eisenchloridlösung, Salzsäure, Rhodanlösung: wie auf Tabelle V.

Phytinlösung: wie auf Tabelle VIII.

3 Phosphatlösungen:

a) 0,0924 g Na_2HPO_4 zu 50 ccm in H_2O gelöst (0,0404% P),
b) 0,4581 „ „ „ 50 „ „ „ „ (0,200% P),
c) 2,2892 „ „ „ 100 „ „ „ „ (0,500% P).

Überall Volumen 100 ccm, darin 10 ccm 6%ige Salzsäure, 2 ccm Rhodanlösung ($^1/_{200}$ normal).

Phytinlösung ccm	Phytin-P mg	Phosphatlösung ccm	Phosphat-P nicht korrigiert mg	Verbraucht Eisenlösung ccm	Fe mg	Fe: Phytin-P	Fe × 1,19 = Phytin-Phosphor gefunden mg	P gefunden zu Phytin-P angewandt %
0,5	2,0	a) 5	2,0	1,0	1,7	0,85	2,0	100
0,5	2,0	b) 5	10,0	1,0	1,7	0,85	2,0	100
0,5	2,0	c) 10	50,0	1,0	1,7	0,85	2,0	100
1,0	4,1	a) 5	2,0	1,9	3,3	0,80	3,9	95
1,0	4,1	b) 5	10,0	2,1	3,6	0,88	4,3	105
1,0	4,1	c) 10	50,0	2,0	3,5	0,85	4,2	102
2,0	8,1	a) 5	2,0	3,7	6,4	0,79	7,6	94
2,0	8,1	b) 5	10,0	3,8	6,6	0,81	7,9	98
2,0	8,1	c) 10	50,0	4,0	6,9	0,85	8,2	101
4,0	16,3	a) 5	2,0	7,7	13,3	0,82	15,8	97
4,0	16,3	b) 5	10,0	7,3	12,6	0,77	15,0	92
4,0	16,3	c) 10	50,0	7,8	13,5	0,83	16,1	99
8,0	32,6	a) 5	2,0	15,9	27,4	0,84	32,6	100
8,0	32,6	b) 5	10,0	15,7	27,1	0,83	32,3	99
8,0	32,6	c) 10	50,0	16,3	28,2	0,87	33,6	103
16,0	65,1	a) 5	2,0	31,6	54,7	0,84	65,1	100
16,0	65,1	b) 5	10,0	31,8	54,9	0,84	65,4	100
16,0	65,1	c) 10	50,0	31,8	54,9	0,84	65,4	100
						Mittel: 0,83		

Aus den Tabellen X und XI läßt sich erkennen, daß die Bestimmung des Phytins auch bei Phosphatgegenwart mit einer

leidlichen Genauigkeit erfolgen kann. Wendet man zur Berechnung des Phytinphosphors aus dem verbrauchten Eisen den Faktor 1,19 an, so erhält man Werte, die mit hinreichender Annäherung zu den angewandten Phytinmengen stimmen. Innerhalb gewisser Grenzen läßt sich jedenfalls der in Form von Phytin vorhandene Phosphor auch bei Gegenwart wechselnder Mengen Phosphat bis auf 1 mg genau ermitteln.

Tabelle XI.

Gemische von Phytinat und Phosphat mit Eisenchlorid titriert.

Eisenchloridlösung, Salzsäure, Rhodanlösung: wie auf Tabelle V.

Phytinlösung: wie auf Tabelle VIII.

2 Phosphatlösungen:

a) 0,0922 g Na_2HPO_4 zu 50 ccm in H_2O gelöst (0,0403% P),

b) 2,2906 „ „ „ 100 „ „ „ „ (0,5005% P).

Überall Volumen 50 ccm, darin 5 ccm 6%ige Salzsäure, 0,67 ccm Rhodanlösung (= $^1/_{300}$ normal).

Phytinlösung ccm	Phytin-P mg	Phosphatlösung ccm	Phosphat-P nicht korrigiert mg	Verbrauchte Eisenlösung ccm	Fe mg	Fe : Phytin-P	Fe × 1,19 = Phytin-Phosphor gefunden mg	P gefunden zu Phytin-P angewandt %
0,5	**2,0**	a) 5	2,0	1,0	1,7	0,85	**2,0**	100
0,5	**2,0**	b) 2	10,0	1,0	1,6	0,80	**1,9**	95
0,5	**2,0**	b) 10	50,0	1,4	2,4	(1,20)	**2,9**	
1,0	**4,1**	a) 5	2,0	2,1	3,5	0,85	**4,2**	102
1,0	**4,1**	b) 2	10,0	2,0	3,4	0,83	**4,0**	98
1,0	**4,1**	b) 2	10,0	2,0	3,4	0,83	**4,0**	98
1,0	**4,1**	b) 10	50,0	2,3	4,0	(0,97)	**4,8**	
2	**8,1**	a) 5	2,0	3,9	6,7	0,83	**8,0**	99
2	**8,1**	b) 2	10,0	4,0	6,8	0,84	**8,1**	100
2	**8,1**	b) 10	50,0	4,5	7,8	(0,96)	**9,3**	
4	**16,3**	a) 5	2,0	7,9	13,6	0,83	**16,2**	99
4	**16,3**	b) 2	10,0	7,8	13,5	0,83	**16,1**	99
4	**16,3**	b) 10	50,0	8,7	15,0	(0,92)	**17,9**	
8	**32,6**	a) 5	2,0	16,5	28,4	0,87	**33,8**	104
8	**32,6**	b) 10	50,0	16,9	29,2	0,90	**34,8**	107
16	**65,1**	a) 5	2,0	32,4	55,9	0,86	**66,5**	102
16	**65,1**	b) 2	10,0	31,6	54,5	0,84	**64,9**	100
16	**65,1**	b) 10	50,0	33,9	58,5	0,90	**69,6**	107
						Mittel: 0,88		

Titration im dreifachen Gemisch.

Endlich wurde der Versuch gemacht, nebeneinander anorganischen Phosphor, Phytinphosphor und Gesamtphosphor in Mischungen von phosphorsaurem, phytinsaurem und glycerinphosphorsaurem Natrium zu bestimmen. Benutzt wurden dazu die im vorstehenden[1]) geschilderten Methoden: einmal 6stündiges Erwärmen auf 37° bei Gegenwart des für die Fällung des Phosphormolybdats notwendigen Reaktionsgemisches, zweitens Titration mit Eisen, und zwar stets im Ausgangsvolumen von 100 ccm bei einer Rhodankonzentration von $^1/_{250}$ normal; endlich wurde nach Veraschung auch der Gesamtphosphor in gewöhnlicher Weise (nach Neumann) bestimmt.

Die Herstellung der Gemische erfolgte durch Mischen von Stammlösungen, die in folgender Weise hergestellt waren:

1. Natriumphytinatlösungen:

a) 4,5674 g lufttrockene Substanz in 200 ccm H_2O gelöst (= 0,407% Phytinphosphor, 0,439% Gesamtphosphor),

b) 2,2839 g lufttrockene Substanz in 200 ccm H_2O gelöst (= 0,203% Phytinphosphor, 0,219% Gesamtphosphor),

c) 5,7154 g lufttrockene Substanz in 200 ccm H_2O gelöst (= 0,509% Phytinphosphor, 0,549% Gesamtphosphor).

2. Glycerinphosphatlösungen:

a) 15,2631 g lufttrockene Substanz in 300 ccm H_2O gelöst (= 0,512% P),

b) 1,0223 g lufttrockene Substanz in 50 ccm H_2O gelöst (= 0,206% P),

c) 1,2722 g lufttrockene Substanz in 50 ccm H_2O gelöst (= 0,255% P).

3. Natriumphosphatlösungen:

a) 0,0919 g trockenes Phosphat in 50 ccm H_2O gelöst (= 0,0402% P),

b) 6,8710 g trockene Substanz in 300 ccm H_2O gelöst (= 0,500% P),

[1]) Vgl. auch die zweitvorige Mitteilung S. 393.

Tabelle XII.

Bestimmung des Gesamtphosphors nach Neumann.

Nr.	Phosphat		Phytinat		Glycerinphosphat		Verbraucht $^1/_2$ n-NaOH	Gefunden P	Berechnet Ges.-P	Gefunden P
	trocken g	P mg	luft-trocken g	P mg	luft-trocken g	P mg	ccm	mg	mg	%
1	9,2	2,0	11,4	2,2	20,4	2,1	11,1	6,3	6,2	101
2	4,6	1,0	5,7	1,1	50,9	5,1	12,7	7,2	7,2	100
3	1,3	0,3	1,6	0,3	71,2	7,2	13,4	7,7	7,8	99
4	18,3	4,0	4,6	0,9	8,1	0,8	8,0	4,6	5,7	80
5	9,2	2,0	2,3	0,4	20,3	2,1	7,9	4,5	4,5	100
6	4,6	1,0	1,1	0,2	50,8	5,1	11,0	6,3	6,3	100
7	22,9	5,0	1,1	0,2	2,0	0,2	9,9	5,6	5,4	103
8	22,9	5,0	1,1	0,2	10,2	1,0	11,2	6,4	6,3	103
9	22,9	5,0	1,1	0,2	50,8	5,1	18,0	10,3	10,3	99
10	9,2	2,0	57,1	11,0	20,4	2,1	26,2	14,9	15,0	99
11	3,7	0,8	22,9	4,4	40,7	4,1	15,8	9,0	9,3	97
12	0,9	0,2	5,7	1,1	50,9	5,1	11,0	6,3	6,4	98
13	18,3	4,0	22,8	4,4	8,1	0,8	16,1	9,2	9,2	100
14	91,6	2,0	11,4	2,2	20,4	2,1	10,7	6,1	6,2	98
15	4,6	1,0	5,7	1,1	50,9	5,1	12,2	7,0	7,2	97
16	27,5	6,0	6,9	1,3	2,4	0,3	13,5	7,7	7,6	101
17	22,9	5,0	5,7	1,1	10,2	1,0	12,7	7,2	7,1	101
18	18,3	4,0	4,6	0,9	40,7	4,1	15,5	8,8	9,0	98
19	1,4	0,3	42,9	8,2	3,1	0,3	15,3	8,7	8,8	98
20	1,1	0,2	34,3	6,6	12,2	1,2	14,1	8,1	8,1	100
21	0,7	0,2	21,4	4,1	3,8	3,8	13,8	7,9	8,1	98
22	5,5	1,2	34,3	6,6	2,4	0,3	13,5	7,7	8,0	96
23	4,6	1,0	28,6	5,5	10,2	1,0	13,2	7,5	7,5	100
24	3,7	0,8	22,9	4,4	40,7	4,1	16,1	9,2	9,3	99
25	18,3	4,0	22,9	4,4	1,6	0,2	14,9	8,5	8,5	100
26	18,3	4,0	22,9	4,4	8,1	0,8	15,3	8,7	9,2	95
27	13,7	3,0	17,2	3,3	30,5	3,1	16,3	9,3	9,4	99

Die Mischung erfolgte bei den Analysen Nr. 1, 2, 3, 10, 11, 12 der Tabellen XII bis XIV in der Weise, daß jede der drei Proben (für die Gesamtbestimmung, für die Eisentitration und die Molybdatfällung) für sich abgemessen und gemischt wurde; in den übrigen Analysen in der Weise, daß erst eine Mischung bereitet und dann wieder aus dieser geeignete Mengen abgemessen wurden. Bei der Berechnung des anorganischen Phosphors mußte natürlich das in dem Phytinpräparat enthaltene Phosphat mit in Rücksicht ge-

zogen werden[1]) (Phosphatphosphor „korrigiert" in den Tabellen).

Tabelle XIII.

Bestimmung des anorganischen Phosphors 6 Std. 37°, Vol. 125 ccm.

Nr.	Anorganisches Phosphat			Phytinat		Glycerinphosphat		Verbraucht $^1/_2$ n-NaOH	P	P
	trocken g	P mg	P korrig. mg	luftrocken g	P korrig. mg	luftrocken g	P mg	ccm	mg	%
1	9,2	2,0	2,2	11,4	2,0	20,5	2,1	3,4	1,9	86
2	9,2	2,0	2,2	11,4	2,0	101,7	10,2	3,5	2,0	91
3	9,2	2,0	2,2	11,4	2,0	508,4	51,2	3,2	1,8	82
4	18,3	4,0	4,0	4,6	0,8	8,1	0,8	6,3	3,6	90
5	18,3	4,0	4,0	4,6	0,8	40,7	4,1	6,5	3,7	93
6	18,3	4,0	4,0	4,6	0,8	203,4	20,5	6,4	3,6	90
7	22,9	5,0	5,0	1,1	0,2	2,0	0,2	8,2	4,7	94
8	22,9	5,0	5,0	1,1	0,2	10,2	1,0	8,0	4,5	90
9	22,9	5,0	5,0	1,1	0,2	50,8	5,1	8,0	4,6	92
10	9,2	2,0	2,8	57,1	10,2	20,5	2,1	3,9	2,2	79
11	9,2	2,0	2,8	57,1	10,2	101,7	10,2	3,8	2,2	79
12	9,2	2,0	2,8	57,1	10,2	508,4	51,2	3,8	2,1	75
13	36,7	8,0	8,7	45,7	8,1	16,3	1,6	13,9	7,9	91
14	36,7	8,0	8,7	45,7	8,1	81,4	8,2	13,5	7,7	89
15	22,9	5,0	5,4	28,6	5,1	254,4	25,6	8,3	4,7	86
16	36,7	8,0	8,2	9,1	1,6	3,3	0,3	14,1	8,0	98
17	36,7	8,0	8,2	9,1	1,6	16,3	1,6	13,2	7,5	92
18	36,7	8,0	8,2	9,1	1,6	81,4	8,2	13,4	7,6	93
19	13,8	3,0	9,0	428,7	76,3	30,5	3,1	7,0	4,0	44
20	13,8	3,0	9,0	428,7	76,3	152,6	15,4	7,1	4,0	44
21	13,8	3,0	9,0	428,7	76,3	763,5	76,8	3,1	1,8	20
22	27,5	6,0	8,4	171,5	30,5	12,2	1,2	12,0	6,9	82
23	27,5	6,0	8,4	171,5	30,5	61,1	6,1	12,0	6,8	81
24	27,5	6,0	8,4	171,5	30,5	305,3	30,7	11,6	6,6	79
25	36,7	8,0	8,7	45,7	8,1	3,3	0,3	14,2	8,1	93
26	36,7	8,0	8,7	45,7	8,1	16,3	1,6	13,4	7,7	89
27	34,4	7,5	8,1	42,9	7,6	76,3	7,7	13,2	7,5	93

Die Resultate sind aus den Tabellen XII, XIII und XIV zu ersehen; sie sind durchaus befriedigend insofern, als mit Ausnahme solcher Mischungen, wo in ganz extremer Weise Glycerinphosphat oder Phosphat über das Phytin oder Phytin über das Phosphat überwogen, sämtliche drei Phosphorarten nebeneinander mit einer Genauigkeit von etwa 1 mg bestimmt werden konnten.

[1]) Vgl. vorhergehende Mitteilung S. 416.

Tabelle XIV.

Bestimmung des Phytinphosphors, Vol. 100 ccm, $^1/_{200}$ n-Rhodankonzentration.

(Eisenlösung, Salzsäure, Rhodanlösung wie auf Tabelle V.)

Nr.	Anorganisches Phosphat			Phytinat		Glycerinphosphat		$FeCl_3$	Fe	Fe : Phytin-P	Fe × 1,19 = Phytin-P gefunden	P
	trocken g	P mg	P korrig. mg	luftrocken g	P korrig. mg	luftrocken g	P mg	ccm	mg	mg	mg	%
1	9,2	2,0	2,2	11,4	2,0	20,5	2,1	1,0	1,7	0,85	2,0	100
2	9,2	2,0	2,2	11,4	2,0	101,7	10,2	1,1	1,9	0,95	2,3	115
3	9,2	2,0	2,2	11,4	2,0	508,4	51,2	1,2	2,0	1,00	2,4	120
4	45,8	10,0	10,2	11,4	2,0	20,5	2,1	1,0	1,7	0,85	2,0	100
5	45,8	10,0	10,2	11,4	2,0	101,7	10,2	1,1	1,9	0,95	2,3	115
6	45,8	10,0	10,2	11,4	2,0	508,4	51,2	ca. 1,5	2,6	1,30	3,1	—
7	229,0	50,0	50,2	11,4	2,0	20,5	2,1	ca. 1,1	1,9	0,95	2,3	115
8	229,0	50,0	50,2	11,4	2,0	101,7	10,2	ca. 1,3	2,2	1,10	2,5	125
9	229,0	50,0	50,2	11,4	2,0	508,4	51,2	—	—	—	—	—
10	9,2	2,0	2,8	57,1	10,2	20,5	2,1	5,1	8,8	0,86	10,5	103
11	9,2	2,0	2,8	57,1	10,2	101,7	10,2	5,3	9,2	0,90	10,9	107
12	9,2	2,0	2,8	57,1	10,2	508,4	51,2	ca. 5,0	8,6	0,84	10,2	100
13	45,8	10,0	10,8	57,1	10,2	20,5	2,1	4,7	8,1	0,79	9,6	94
14	45,8	10,0	10,8	57,1	10,2	101,8	10,2	4,9	8,5	0,83	10,1	99
15	45,8	10,0	10,8	57,1	10,2	508,8	51,2	5,4	9,3	0,91	11,1	109
16	229,1	50,1	50,9	57,1	10,2	20,5	2,1	5,5	9,5	0,93	11,3	111
17	229,1	50,1	50,9	57,1	10,2	101,8	10,2	5,6	9,7	0,95	11,5	113
18	229,1	50,1	50,9	57,1	10,2	508,8	51,2	—	—	—	—	—
19	9,2	2,0	6,0	285,8	50,9	20,5	2,1	24,4	42,2	0,83	50,2	99
20	9,2	2,0	6,0	285,8	50,9	101,7	10,2	24,4	42,2	0,83	50,2	99
21	9,2	2,0	6,0	285,8	50,9	508,7	51,2	ca. 25,2	43,6	0,86	51,9	102
22	45,8	10,0	14,0	285,8	50,9	20,5	2,1	24,4	42,2	0,83	50,2	99
23	45,8	10,0	14,0	285,8	50,9	101,8	10,2	ca. 24,1	41,6	0,82	49,5	97
24	45,8	10,0	14,0	285,8	50,9	508,8	51,2	25,5	44,1	0,87	52,5	103
25	229,1	50,1	54,1	285,8	50,9	20,5	2,1	ca. 25,4	43,8	0,86	52,1	102
26	229,1	50,1	54,1	285,8	50,9	101,8	10,2	25,7	44,4	0,87	52,9	104
27	229,1	50,1	54,1	285,8	50,9	508,8	51,2	—	—	—	—	—

Für die Bestimmung des anorganischen Phosphats ließe sich noch ein Korrekturfaktor von etwa 1,1 verwenden, durch den eine noch befriedigendere Übereinstimmung der gefundenen zu den berechneten Zahlen erzielt werden würde. Außerdem wäre eine nochmalige Umfällung des Molybdatniederschlags in Betracht zu ziehen.

Bei der Ausführung der Analysen hat uns Frl. Gertrud Hildenbrandt wesentliche Dienste geleistet.

Zusammenfassung.

Phytinsäure läßt sich bei Gegenwart von 0,6% Salzsäure mit einer ebensoviel Salzsäure enthaltenden Eisenchloridlösung von 0,05 bis 0,2% Eisengehalt bequem gegen Rhodanammonium als Indicator titrieren, dessen Konzentration am besten zu 0,03% im Ausgangsvolumen von 100 ccm gewählt wird.

Jedem mg Eisen entspricht ziemlich genau 1,19 mg Phytinphosphor.

Die Titration gelingt auch bei Gegenwart von anorganischem Phosphat oder Phosphorsäureestern, die bei saurer Reaktion durch Eisen nicht gefällt werden, falls diese Substanzen nicht in sehr großem Überschuß gegenüber dem Phytin zugegen sind.

Die Aminosäuren des durch Schwefelsäure hydrolysierten Pferdefleisches.

Von

Tullio Gayda.

(Aus dem Physiologischen Institut der Kgl. Universität Turin.)

(Eingegangen am 18. Mai 1914.)

Vor zwei Jahren hat Prof. Herlitzka Pferdefleisch der vollständigen Hydrolyse mit Schwefelsäure unterzogen. Da es nun interessant wäre, den Gehalt an Aminosäuren dieses Hydrolysats kennen zu lernen, habe ich mich mit dieser Frage beschäftigt.

Bezüglich der Qualität und Quantität von Aminosäuren, die durch Hydrolyse mit Säuren aus der Muskelsubstanz erhalten werden können, wurden schon einige Untersuchungen ausgeführt.

Soave[1]) bestimmte den Stickstoff der nach der Methode von Kossel und Kutscher isolierten Hexonbasen (Histidin, Arginin, Lysin), die bei der Hydrolyse des Rinds- und Kaninchenmuskels oder der Eiweißstoffe des Muskels selbst (Myosin, Myogen) mittels der Schwefelsäure entstehen und gelangte zum Schlusse, daß ein Teil der im Muskel enthaltenen Hexonbasen sich im freien Zustand oder wenigstens unter nicht an das Eiweißmolekül gebundener Form vorfinden.

Barker und Cohoe[2]) führten ihre Analysen aus an mit Salzsäure hydrolysiertem Rind-, Schweine-, Hühner- oder Fischfleisch. Sie bestimmten im Hydrolysat zuerst den Ammoniakstickstoff und den Melaninstickstoff; von dem verbleibenden Stickstoff bestimmten sie dann den mit Phosphorwolframsäure fällbaren, den sie als Diaminostickstoff betrachten, und den nicht mit derselben Säure fallbaren, den sie als Monoaminostickstoff betrachten.

---

[1]) M. Soave, Atti della R. Accad. delle Scienze di Torino **40**, 831, 1905.

[2]) L. F. Barker and B. A. Cohoe, Journ. of Biolog. Chem. **1**, 229, 1905.

Stickstoffbestimmungen der nach der Methode von Kossel und Kutscher aus den mit Schwefelsäure hydrolysierten Hundemuskeln isolierten Hexonbasen führte auch Wakeman[1]) aus, wobei er zu ähnlichen Resultaten gelangte, wie Soave sie erhalten hatte.

Osborne, Heyl und Jones[2]), die die Fischersche Estermethode und die modifizierte Hausmannsche Methode befolgten, bestimmten in den mit Salzsäure hydrolysierten Hühner-, Heilbutt-, Kammuschel- und Rindsmuskeln Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Prolin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin, Arginin, Histidin, Lysin, Ammoniak und Tryptophan.

Ebenfalls mit Hilfe der Estermethode bestimmten Abderhalden, Brahm und Weil[3]) den Gehalt an Aminosäuren der Muskelsubstanz der ägyptischen Mumien. Aus dem wässerigen Extrakt isolierten sie Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin und Prolin. Dadurch ist bewiesen, daß die Erhaltung der Leichen die Autolyse nicht völlig ausgeschlossen hat. Der Rückstand lieferte nach vollständiger Extraktion mit Wasser und nach der Hydrolyse mit Schwefel- oder Salzsäure noch Aminosäuren. Es fanden sich Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin vor. Bei einem anderen Mumienmaterial konnten sie mit der Kosselschen Methode Lysin, Arginin und Histidin nachweisen. Diese Beobachtung läßt wohl kaum eine andere Deutung zu, als daß in der Mumiensubstanz noch Eiweißkörper vorhanden waren.

In jüngster Zeit bestimmten Buglia und Costantino[4]), indem sie die Formolmethode von Sörensen verwendeten, in der durch Hydrolyse der quergestreiften, glatten und Herzmuskulatur des Stieres mittels der Salzsäure erhaltenen Flüssigkeit den Ammoniakstickstoff, den Gesamtaminostickstoff (Stickstoff der Aminosäuren), den mit der Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff oder Diaminostickstoff (Stickstoff der Diaminosäuren) und den nicht fällbaren oder Monoaminostickstoff (Stickstoff der Monoaminosäuren). Buglia und Costantino fanden, daß in allen drei Muskelarten der durch Formol titrierbare Monoaminostickstoff in größerer Menge vorhanden ist als der durch Formol titrierbare Diaminostickstoff, und daß die analysierten, auf die Trockensubstanz bezogenen einzelnen Stickstofffraktionen denselben Wert in den drei Muskelarten haben. In gleicher Weise sind keine Unterschiede vorhanden zwischen dem Gehalt an Gesamtstickstoff und an durch Formol titrierbarem

[1]) A. J. Wakeman, Journ. of Biolog. Chem. 4, 119, 1908.

[2]) T. B. Osborne and F. W. Heyl, Amer. Journ. of Physiol. 22, 433, 1908; 23, 81, 1908. — T. B. Osborne and D. B. Jones, Amer. Journ. of Physiol. 24, 161, 437, 1909.

[3]) E. Abderhalden und C. Brahm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 61, 419, 1909. — E. Abderhalden und A. Weil, Zeitschr. f. physiol. Chem. 72, 15, 1911.

[4]) G. Buglia und A. Costantino, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 109, 1912.

Aminostickstoff des Stromas und dem des extrahierbaren Myoproteins, sowohl des Muskels selbst als der glatten oder quergestreiften Muskulatur.

In anderen Arbeiten bestimmten Buglia und Costantino[1]) in der glatten, quergestreiften und Herzmuskulatur des Stieres den Stickstoff einiger Extraktivstoffe und der Purinbasen und den durch Formol titrierbaren freien Aminostickstoff; auch dehnten sie die Bestimmungen des Extraktivstickstoffes und des durch Formol titrierbaren freien Aminostickstoffes auf die Muskulatur verschiedener Tierarten aus und führten Bestimmungen des Gesamtaminostickstoffes und des durch Formol titrierbaren freien Aminostickstoffes in der Muskulatur des Rindembryos aus.

Zuletzt sind noch zu erwähnen die Untersuchungen von Hart[2]) und von Abderhalden und Sasaki[3]) über die Aminosäuren des Syntonins aus Rindfleisch. Hart hydrolysierte das Syntonin mit Schwefelsäure und bestimmte den Stickstoff des Ammoniaks, der Huminsubstanz und der mit der Methode von Kossel und Kutscher isolierten Hexonbasen. Abderhalden und Sasaki hydrolysierten das Syntonin mit Schwefelsäure oder mit Salzsäure und bestimmten im Hydrolysat mit der Estermethode Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Prolin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin und Tyrosin.

Das Hydrolysat, das ich analysierte, wurde von Professor Herlitzka auf folgende Weise bereitet: 2 kg Pferdefleisch, das aus der Schenkelmuskulatur eines frisch im Schlachthause getöteten Tieres stammte, wurden sorgfältig von Bindegewebe und Fett befreit und mit der Fleischzerreibemaschine zerrieben. Der auf diese Weise erhaltene Muskelbrei wurde mit 10 l 25%iger Schwefelsäure in einem großen Rundkolben am Rückflußkühler 16 Stunden lang kochen lassen. Aus der Hydrolyseflüssigkeit wurde hierauf die ganze Schwefelsäure entfernt, indem die Flüssigkeit zuerst mit Bariumcarbonat und endlich mit Bariumhydratlösung behandelt wurde, um das Zurückbleiben von Baryt in der Flüssigkeit zu verhüten, was bei gewöhnlicher Entfernung der Schwefelsäure, wie Abderhalden und Frank[4]) nachgewiesen haben, vorkommt. Zu diesem Zwecke wurde der Zusatz von Bariumhydrat nicht so lange fortgesetzt, bis die Flüssigkeit neutrale Reaktion zeigte, sondern nur so lange, bis

---

[1]) G. Buglia und A. Costantino, Zeitschr. f. physiol. Chem. **81**, 120, 130, 143, 155, 1912; 82, 439, 1912.

[2]) E. Hart, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 345, 1901.

[3]) E. Abderhalden und T. Sasaki, Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 404, 1907.

[4]) E. Abderhalden und O. Frank, Zeitschr. f. physiol. Chem. **64**, 158, 1910.

diese weder mit Bariumhydrat noch mit Schwefelsäure einen weiteren Niederschlag aufwies. Die filtrierte Flüssigkeit wurde im Wasserbade verdampft und der Rückstand im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Im getrockneten Hydrolysat nahm ich dann die Bestimmung der Aminosäuren vor unter Verwendung der von van Slyke[1]) ersonnenen Methode, die darin besteht, nicht die einzelnen Aminosäuren zu isolieren, sondern ihre charakteristischen chemischen Gruppen zu bestimmen. Diese Methode besteht in Kürze in folgendem: Nachdem das Ammoniak durch Destillation im Vakuum und die Melanine durch Adsorption durch Kalk entfernt sind, werden Arginin, Histidin, Lysin und Cystin mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wird aufgelöst und diese vier Basen werden auf Grund ihrer verschiedenen charakteristischen chemischen Eigenschaften quantitativ bestimmt. Durch die Bestimmung des Gehaltes an Aminostickstoff und Gesamtstickstoff dieser Fraktion erhält man den Gehalt an Nicht-Aminostickstoff, woraus man den Gehalt an Histidin ($^2/_3$ Nicht-Aminostickstoff) und an Arginin ($^3/_4$ Nicht-Aminostickstoff) erhält. Der übrige Stickstoffgehalt dieser Fraktion besteht aus den beiden Basen Lysin und Cystin, die nur Aminostickstoff enthalten. Der Gehalt an Cystin wird durch eine Schwefelanalyse bestimmt, der an Lysin durch Subtraktion des Cystingehaltes von der Summe der Gehalte an diesen beiden Stoffen. Der Arginingehalt wird bestimmt durch Zersetzung mit Alkali, das die Hälfte des Stickstoffes in Form von Ammoniak abspaltet; der Histidingehalt wird wieder vermittelst einer Subtraktion festgestellt. Die Aminosäuren im Filtrat der Basen werden in zwei Unterfraktionen geteilt: 1. diejenigen die nur primären Aminostickstoff enthalten, wie Leucin, Alanin usw.; 2. diejenigen, die sekundären Aminostickstoff enthalten, wie er im Pyrrolidinring (Prolin, Oxyprolin) oder im Indolkern (Tryptophan) vorkommt.

Es ist jedoch zu bemerken, daß die van Slykesche Methode offenbar nur dann anwendbar ist, wenn unter den mit Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff enthaltenden Stoffen keine anderen als Arginin, Histidin, Lysin und Cystin vorhanden sind.

[1]) Donald D. van Slyke, Journ. of Biolog. Chem. 9, 185, 1911; 10, 15, 1911.

Anderenfalls ist es nötig zu wissen, welches diese Stoffe sind, und sie quantitativ zu bestimmen. Was nun das Fleisch anbetrifft, so enthält dieses mehrere stickstoffhaltige Stoffe, die mit Phosphorwolframsäure fällbar sind, und darunter einige, die, der Wirkung von Säuren unterzogen, den Vorgang der Hydrolyse nicht erfahren und sich unverändert verhalten. Während nämlich die im frischen Fleisch enthaltenen Purinkörper hydrolysiert werden und sich deshalb nicht mehr als solche im Hydrolysat vorfinden (tatsächlich erhielt ich in dem von mir analysierten Fleischhydrolysat keinen Niederschlag mit einer ammoniakalischen Silberlösung), wandelt sich das mit Mineralsäuren gekochte Kreatin in Kreatinin um und findet sich unter dieser Form im Hydrolysat wieder, zugleich mit dem im frischen Muskel präexistierenden Kreatinin, indem es mit großer Deutlichkeit alle seine charakteristischen Reaktionen ergibt. Was das Karnosin betrifft, das ein aus Histidin und Alanin bestehendes Dipeptid vorstellt[1]), so wird es unter der Säurewirkung in seine Bestandteile zerfallen. Das Karnitin und die anderen ähnlichen Basen, die sich jedoch im Fleisch in sehr kleinen Mengen vorfinden, werden auch aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Wirkung der Säuren hydrolysiert.

Um die van Slykesche Methode beim Fleischhydrolysat zu verwenden, muß man also den Gehalt des letzteren an Kreatinin kennen. Dieser Gehalt wurde in dem von mir analysierten Hydrolysat colorimetrisch mittels der Folinschen Methode[2]) bestimmt, die eigens von Grindley, Woods und Emmett[3]) für das Fleisch und die Fleischpräparate modifiziert worden ist.

Aber hinsichtlich der Anwesenheit des Kreatinins im Fleischhydrolysat muß man bei Verwendung der van Slykeschen Methode noch einen anderen Umstand in Erwägung ziehen. Bei dieser Methode wird die Argininmenge auf Grund der Ammoniakmenge bestimmt, die das Arginin entwickelt, wenn man es 6 Stunden lang mit Kaliumhydrat und zugleich mit den

[1]) W. Gulewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 535, 1907.

[2]) O. Folin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 223, 1904.

[3]) H. S. Grindley and H. S. Woods, Journ. of Biolog. Chem. **2**, 309, 1906. — A. D. Emmett and H. S. Grindley, Journ. of Biolog. Chem. **3**, 491, 1907.

anderen stickstoffhaltigen Stoffen, die mit Phosphorwolframsäure niedergeschlagen wurden, kochen läßt. Da sich nun unter diesen auch das Kreatinin befindet, das ähnlich wie das Arginin mit Alkali gekocht Ammoniak entwickelt, muß man die Ammoniakmenge kennen, die von dem Kreatinin allein während des 6stündigen Kochens mit Kaliumhydrat entwickelt wird, um in geeigneter Weise die vom Arginin unter den gleichen Bedingungen entwickelte Menge berechnen zu können. Zu diesem Zwecke führte ich einige Kontrollversuche an einer Kreatininlösung aus. Um die gleichen Bedingungen wie beim Fleischhydrolysat schaffen zu können, stellte ich das Kreatinin her, indem ich krystallisiertes Kreatin 16 Stunden lang der Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure unterzog. Der größte Teil der Schwefelsäure wurde dann mit Bariumcarbonat entfernt und die filtrierte Flüssigkeit blieb nur schwach sauer (0,073 n.). Von dieser Flüssigkeit wurde endlich colorimetrisch der Kreatiningehalt nach der Folinschen Methode bestimmt. Es ergab sich, daß die Lösung 0,108% Kreatinin enthielt. Hierauf ließ ich 25 ccm dieser Lösung 6 Stunden lang mit 12,5 g festen Kaliumhydrats in demselben Kolben am Rückflußkühler kochen, der zur Analyse des Arginins bei der van Slykeschen Methode verwendet worden war, und wie bei dieser ließ ich das entwickelte Ammoniak durch 15 ccm von 0,1 n. Säure absorbieren. Als Mittel von zwei gut übereinstimmenden Bestimmungen wurde gefunden, daß die Menge des in Form von Ammoniak durch die analysierten 25 ccm Lösung entwickelten Stickstoffes 0,0143 g betrug, während die Menge des in den 25 ccm Lösung in Form von Kreatinin enthaltenen Stickstoffes nur 0,0100 g war. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach der Kjeldahlschen Methode wies jedoch nach, daß in 25 ccm Lösung 0,0146 g Stickstoff enthalten waren, ein Wert, der sehr ähnlich dem ist, den wir oben für die Menge des in Form von Ammoniak entwickelten Stickstoffes angetroffen haben. Die analysierte Lösung enthielt also außer dem Kreatinin auch andere stickstoffhaltige Stoffe, aber alle diese Stoffe, und mithin auch das Kreatinin, entwickelten, nachdem sie 6 Stunden lang mit Kaliumhydrat gekocht worden waren, ihren ganzen Stickstoff in Form von Ammoniak. Um also nach der van Slykeschen Methode die Argininstickstoffmenge im Fleischhydrolysat be

rechnen zu können, muß man nicht den ganzen Stickstoff in Betracht ziehen, der in Form von Ammoniak beim Kochen der mit Phosphorwolframsäure gefällten Stoffe mit Kaliumhydrat entwickelt wurde, sondern man muß zuerst den ganzen Kreatininstickstoff davon subtrahieren.

Endlich bestimmte ich in anderen Experimenten die Kreatininmenge, die noch nach der Fällung mit Phosphorwolframsäure in Lösung bleiben konnte. Ein Volumen derselben Kreatininlösung, die bei den vorhergehenden Experimenten verwendet worden war und nur 15 mg Kreatinin enthielt, wurde mit destilliertem Wasser bis zu ungefähr $^1/_2$ l verdünnt. Ihm wurden 90 ccm konz. Salzsäure und eine 75 g Phosphorwolframsäure enthaltende Lösung zugesetzt; das Ganze wurde dann mit destilliertem Wasser bis zu 1 l verdünnt. Auf dem Boden des Gefäßes sammelte sich ein krystallinischer Niederschlag, der obwohl in kleiner Menge vorhanden, doch immerhin ganz augenfällig war. Die Lösung wurde alsdann 48 Stunden lang in Ruhe gelassen und hierauf filtriert. Der Niederschlag wurde auf dem Filter ausgewaschen mit kleinen Mengen einer Lösung, die 2,5 % Phosphorwolframsäure und 3,5 % Salzsäure enthielt. Das Filtrat mit der Waschflüssigkeit wurde mit Natriumhydrat neutralisiert und mit destilliertem Wasser bis auf 4 l verdünnt. Diese Verdünnung war nötig, um Kreatininverluste durch Adsorption durch Bariumphosphorwolframat zu vermeiden. Die Phosphorwolframsäure wurde mit Bariumchlorid in geringem Überschuß gefällt, der Niederschlag auf einem Filter gesammelt und bis zum Verschwinden der Chloride ausgewaschen. Das Filtrat mit der Waschflüssigkeit wurde im Wasserbad bis auf das Volumen von ca. 1 l konzentriert, und von ihm wurde mittels einer neuen Filtration das Bariumphosphorwolframat, das während der Konzentration der Flüssigkeit gefällt war, getrennt. In der auf diese Weise erhaltenen Flüssigkeit wurde das noch in Form von Chlorid vorhandene Barium mit Schwefelsäure in geringem Überschuß gefällt, der Niederschlag wurde durch Filtration entfernt und das neue Filtrat wurde im Wasserbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit heißem Alkohol extrahiert, der Alkohol im Wasserbad verdampft und endlich bei dem in wenig Wasser gelösten Rückstand colorimetrisch der Kreatiningehalt nach der Folinschen Methode bestimmt.

Es fand sich, daß der Kreatiningehalt in diesem Rückstand 0,000 21 g betrug. Daraus ergibt sich, daß, wenn man die Fällung der Aminobasen mit Phosphorwolframsäure nach der van Slykeschen Methode in einer Lösung von 200 ccm Volumen ausführt, 0,000 042 g Kreatinin, d. h. 0,000 015 6 g Kreatininstickstoff darin gelöst bleiben. Nun befindet sich ein solcher Wert innerhalb der Fehlergrenze und kann deshalb vollständig unberücksichtigt bleiben.

Folgende sind nun die Resultate der von mir am trockenen Pferdefleischhydrolysat ausgeführten Analysen:

Allgemeine Reaktionen.

Eine wässerige Lösung der Trockensubstanz gab die folgenden allgemeinen Reaktionen:

1. Die ammoniakalische Silberlösung erzeugte keine Fällung.
2. Die Murexidprobe war negativ.
3. Die Biuretreaktion war negativ.
4. Die Xanthoproteinreaktion war positiv.
5. Die Millonsche Reaktion war positiv.
6. Die Reaktion von Molisch war schwach positiv.
7. Die Tryptophanreaktionen (mit Bromwasser, Glyoxylsäure, aromatischen Aldehyden) waren negativ.

Gesamtstickstoff.

I. 0,3961 g Trockensubstanz gaben 0,0531 g N = 13,40 % N,
II. 0,3904 g „ „ 0,0522 g N = 13,38 % N,
Mittel = 13,39 % N.

Asche.

I. 1,0997 g Trockensubstanz gaben 0,0346 g Asche = 3,15 % Asche,
II. 1,2037 g „ „ 0,0383 g „ = 3,18 % „
Mittel = 3,16 % Asche.

Die Asche wurde auf das Vorhandensein von Barium geprüft und davon keine Spur nachgewiesen.

Kreatinin.

1,2886 g Trockensubstanz gaben 0,0084 g Kreatinin = 0,65 % Kreatinin = 0,24 % Kreatinin-N.

Stickstoff der einzelnen Fraktionen.

I. 3,1246 g Trockensubstanz gaben:
0,0169 g Ammoniak-N = 0,542 % Ammoniak-N,
0,0024 g Melanin-N = 0,076 % Melanin-N.

Die ammoniak- und melaninfreie Lösung wurde durch Fällung mit Phosphorwolframsäure in Fraktion A (Basenniederschlag) und Fraktion B (Filtrat der Basen) getrennt.

Fraktion A wurde gelöst und die Lösung, nach Entfernung der Phosphorwolframsäure, auf 75 ccm konzentriert:

a) 15 ccm wurden zur Bestimmung des Cystins gebraucht. Es ergaben sich 0,0129 g $BaSO_4$
= 0,00387 g Cystin-N in der gesamten Basenlösung,
= 0,124% „ auf Trockensubstanz bezogen.

b) 30 ccm wurden zur Bestimmung des Arginins gebraucht. Es ergaben sich 0,0168 g N in Form von NH_3. Die Korrektur für das Kreatinin und das Cystin betrug 0,0033 g N. Auf das Arginin entfielen also 0,0135 g N
= 0,0675 g Arginin-N in der gesamten Basenlösung,
= 2,160% „ auf Trockensubstanz bezogen.

c) Dieselben für die Argininbestimmung gebrauchten 30 ccm gaben bei einer Kjeldahlbestimmung 0,0494 g N
= 0,1655 g Gesamt-N in der gesamten Basenlösung,
= 5,300% „ der Basen auf Trockensubstanz bezogen.

d) 10 ccm wurden zur Bestimmung des Aminostickstoffs der Basen gebraucht. Es ergaben sich 0,0210 g N
= 0,0785 g Amino-N in der gesamten Basenlösung,
= 2,511% „ der Basen auf Trockensubstanz bezogen.

Fraktion B wurde neutralisiert und auf 150 ccm konzentriert:

a) 25 ccm wurden zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs des Filtrats der Basen gebraucht. Er ergaben sich 0,0391 g N
= 0,2344 g Gesamt-N in dem gesamten Filtrate,
= 7,501% „ des Filtrats auf Trockensubstanz bezogen.

b) 10 ccm wurden zur Bestimmung des Aminostickstoffs des Filtrats der Basen gebraucht. Es ergaben sich 0,0249 g N
= 0,1868 g Amino-N in dem gesamten Filtrate,
= 5,979% „ des Filtrats auf Trockensubstanz bezogen.

II. 2,9949 g Trockensubstanz gaben:
0,0165 g Ammoniak-N = 0,552% Ammoniak-N,
0,0022 g Melanin-N = 0,075% Melanin-N.

Die ammoniak- und melaninfreie Lösung wurde durch Fällung mit Phosphorwolframsäure in Fraktion A (Basenniederschlag) und Fraktion B (Filtrat der Basen) getrennt.

Fraktion A wurde gelöst und die Lösung, nach Entfernung der Phosphorwolframsäure, auf 75 ccm konzentriert:

a) 15 ccm wurden zur Bestimmung des Cystins gebraucht. Es ergaben sich 0,0119 g $BaSO_4$
= 0,00357 g Cystin-N in der gesamten Basenlösung,
= 0,119% „ auf Trockensubstanz bezogen.

b) 30 ccm wurden zur Bestimmung des Arginins gebraucht. Es ergaben sich 0,0165 g N in Form von NH_3. Die Korrektur für das Krea-

tinin und das Cystin betrug 0,0032 g N. Auf das Arginin entfielen also 0,0133 g N

= 0,0668 g Arginin-N in der gesamten Basenlösung,
= 2,230% „ auf Trockensubstanz bezogen.

c) Dieselben für die Argininbestimmung gebrauchten 30 ccm gaben bei einer Kjeldahlbestimmung 0,0469 g N

= 0,1585 g Gesamt-N in der gesamten Basenlösung,
= 5,294% „ der Basen auf Trockensubstanz bezogen.

d) 10 ccm wurden zur Bestimmung des Aminostickstoffs der Basen gebraucht. Es ergaben sich 0,0200 g N

= 0,0747 g Amino-N in der gesamten Basenlösung,
= 2,495% „ der Basen auf Trockensubstanz bezogen.

Fraktion B wurde neutralisiert und auf 150 ccm konzentriert:

a) 25 ccm wurden zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs des Filtrats der Basen gebraucht. Es ergaben sich 0,0377 g N

= 0,2260 g Gesamt-N in dem gesamten Filtrate,
= 7,545% „ des Filtrats auf Trockensubstanz bezogen.

b) 10 ccm wurden zur Bestimmung des Aminostickstoffs des Filtrats der Basen gebraucht. Es ergaben sich 0,0239 g N

= 0,1792 g Amino-N in dem gesamten Filtrate,
= 5,984% „ des Filtrats auf Trockensubstanz bezogen.

In der folgenden Tabelle sind die Resultate der Analysen zusammengestellt. Der Stickstoff der einzelnen Fraktionen ist auf 100 Teile des direkt bestimmten Gesamtstickstoffs bezogen. Der Histidin- und Lysinstickstoff wurde nach van Slyke berechnet. Unter dem Worte „korrigiert" befinden sich die Werte, bei denen die für die Löslichkeiten der Basen erforderlichen Korrekturen angebracht worden sind.

Tabelle.

Stickstofffraktionen	I		II		Mittel	
	nicht korrigiert	korrigiert	nicht korrigiert	korrigiert	nicht korrigiert	korrigiert
Ammoniak-N	4,05	4,05	4,12	4,12	4,09	4,09
Melanin-N	0,57	0,57	0,56	0,56	0,56	0,56
Kreatinin-N	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82	1,82
Cystin-N	0,93	1,55	0,89	1,54	0,91	1,54
Arginin-N	16,13	16,90	16,67	17,46	16,40	17,18
Histidin-N	10,35	11,26	9,89	10,84	10,12	11,05
Lysin-N	10,35	10,47	10,28	10,41	10,32	10,44
	39,58	42,00	39,55	42,07	39,57	42,03
Amino-N des Filtrats	44,67	43,42	44,71	43,41	44,69	43,42
Nicht-Amino-N des Filtrats	11,37	10,20	11,66	10,44	11,51	10,32
	56,04	53,62	56,37	53,85	56,20	53,74
Summe	100,24	100,24	100,60	100,60	100,42	100,42

Wenn wir jetzt die in dieser Tabelle enthaltenen Werte mit den entsprechenden vergleichen, welche die anderen Autoren bei anderen Tieren als beim Pferde erhalten haben, so finden wir sehr erhebliche Unterschiede. Während nämlich nach meinen Analysen beim Pferde der Ammoniakstickstoff 4,09% des Gesamtstickstoffs und der Melaninstickstoff 0,56% betragen, beträgt nach Barker und Cohoe der Ammoniakstickstoff 6,43% beim Schwein, bis 7,16% beim Huhn und der Melaninstickstoff 1,48% beim Fisch, bis 2,40% beim Rind, nach Osborne, Heyl und Jones der Ammoniakstickstoff 5,50% beim Rind, bis 7,46% beim Huhn und der Melaninstickstoff 2,35% bei der Kammuschel, bis 2,73% beim Huhn, nach Buglia und Costantino der Ammoniakstickstoff 7,78% beim Rind. Die Unterschiede sind dann noch erheblicher, so weit sie den mit Phosphorwolframsäure fällbaren und den nicht damit fällbaren Stickstoff betreffen, nachdem der Ammoniak- und der Melaninstickstoff abgezogen sind. Bei meinen Analysen beträgt der mit Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff 42,03% des Gesamtstickstoffs und der nicht fällbare 53,74%, nach Barker und Cohoe beträgt der mit Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff 25,46% beim Rind und beim Huhn, bis 30,01% beim Schwein und der nicht fällbare 61,78% beim Schwein, bis 65,98% beim Rind, nach Osborne, Heyl und Jones der fällbare Stickstoff 26,51% bei der Kammuschel, bis 30,18% beim Fisch, und der nicht fällbare 59,84% beim Huhn, bis 64,81% bei der Kammuschel, nach Buglia und Costantino dagegen beim Rind der fällbare Stickstoff, mit Einschluß des Melaninstickstoffs, 55,03% und der nicht fällbare Stickstoff nach Abzug des Ammoniakstickstoffs 37,19%; nach Buglia und Costantino ist also das Verhältnis zwischen mit Phosphorwolframsäure fällbarem und nicht fällbarem Stickstoff das umgekehrte von dem, was die anderen Autoren beobachtet haben. Wenn man endlich den Stickstoff der einzelnen Basen in Erwägung zieht, bemerkt man, daß die von mir erhaltenen Werte im allgemeinen größer sind als die von den anderen Autoren erhaltenen. Während nämlich bei meinen Analysen der Argininstickstoff 17,18% des Gesamtstickstoffs darstellt, beträgt er nach Soave nur 9,67% beim Rind und 10,45% beim Kaninchen und nach Wakeman 9,46% beim

Hunde; so beträgt auch der Histidinstickstoff nach meinen Analysen 11,05% des Gesamtstickstoffs, während er nach Soave 3,65% beim Rind und 2,79% beim Kaninchen und nach Wakeman 2,94% beim Hunde beträgt; der Lysinstickstoff dagegen, der nach meinen Analysen 10,44% des Gesamtstickstoffs ausmacht, hat keine sehr verschiedenen Werte nach den Analysen der anderen Autoren; so sind die von Soave berichteten Werte 11,64% beim Rind und 11,19% beim Kaninchen und der von Wakeman angeführte Wert ist 8,44% beim Hunde.

Alle Unterschiede, die wir hier angetroffen haben, sind wahrscheinlich eher einer Verschiedenheit der verwendeten Bestimmungsmethoden als einer verschiedenen chemischen Zusammensetzung des Fleisches der verschiedenen Tiere zuzuschreiben.

Untersuchungen über die Bedeutung der Schilddrüse für den Kohlenhydratstoffwechsel.

Von

Gunnar Böe (Bergen).

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 28. April 1914.)

Zwischen den Einflüssen der verschiedenen endokrinen Organe auf den Stoffwechsel besteht bekanntlich eine nachweisbare Wechselwirkung. Die spezifischen Hormone vermehren sowohl die Assimilation als auch die Dissimilation, halten aber unter normalen Verhältnissen einander das Gleichgewicht. Dies findet beim Kohlenhydratstoffwechsel darin seinen Ausdruck, daß der Zuckergehalt des Blutes, von kurzen physiologischen Schwankungen abgesehen, konstant ist.

Die Organe, die in erster Linie für die Regulierung des Zuckerstoffwechsels von Bedeutung sind, sind Bauchspeicheldrüse, Nebennieren, Schilddrüse und Hypophyse. Es ist möglich, daß auch andere Organe mit innerer Sekretion hierfür ihre Bedeutung haben, aber hierüber weiß man noch wenig.

Nach den vorliegenden experimentellen und klinischen Erfahrungen ist die Assimilationsfähigkeit der Kohlenhydrate hauptsächlich von der inneren Sekretion des Pankreas abhängig. Dagegen wirken die Nebennieren mobilisierend auf das Glykogen. Das Pankreashormon ist unbekannt; die wirksame Substanz der Nebennieren ist das Adrenalin, das vom chromaffinen Gewebe hervorgebracht wird. Eine Injektion von Nebennierenextrakt oder Adrenalin ruft Hyperglykämie hervor; die Exstirpation der Nebennieren hat dagegen eine Verringerung des Blutzuckers zur Folge; diese sieht man oft auch bei Morbus Addissonii. Bis vor kurzer Zeit wußte man nur wenig von der Rolle der Hypophyse. Die allgemeine Auffassung war, daß auch dies Organ die Zuckerproduktion stimulierte. Hierfür sprachen u. a. Borchardts[1]) Versuche,

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. **66**, 332, 1908.

bei denen die Injektion von Hypophysenextrakt Hyperglykämie und Glucosurie bewirkt hat; das häufige Vorkommen von Glucosurie und Diabetes bei Akromegalie stimmte anscheinend gut hierzu. Indessen hat neulich Stenström[1]) gezeigt, daß Pituitrin die Adrenalinhyperglykämie hemmt, wenn es $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde vor dem Adrenalin subcutan injiziert wird. Intravenöse Injektion kleiner Dosen, 1 ccm, verändert den Blutzucker nicht; größere Dosen riefen Hyperglykämie hervor. Subcutane Injektion von Pituitrin, selbst in großen Dosen, 10 ccm, verändert den Blutzucker nicht. Pituitrin ist wie bekannt ein Extrakt aus dem mittleren und hinteren Teile der Hypophyse. Wie der Extrakt aus dem vorderen Teile auf den Blutzucker wirkt, ist zurzeit noch unbekannt.

Der Einfluß der Schilddrüse auf den Kohlenhydratstoffwechsel ist auch noch nicht völlig aufgeklärt. Man liest oft, daß sie die Zuckerproduktion vermehrt.

Eppinger, Falta und Rudinger[2]) meinen, daß dies dadurch geschieht, daß die Schilddrüse inzitierend auf die Nebennieren wirkt und gleichzeitig das Pankreas hemmt.

Die vorliegenden klinischen und experimentellen Untersuchungen haben jedoch keinen vollgültigen Beweis für die Richtigkeit dieser Theorie erbringen können.

Um die Bedeutung der Schilddrüse für den Zuckerstoffwechsel aufzuklären, haben sowohl klinische wie experimentelle Untersucher die Wirkung des Hyperthyreoidismus und Hypothyreoidismus auf den Kohlenhydratstoffwechsel zum Ausgangspunkt genommen. Da Basedowsche Krankheit und Myxödem gewöhnlich als Folge einer vermehrten bzw. verminderten Schilddrüsenfunktion aufgefaßt werden, konzentrieren sich die klinischen Untersuchungen auf diese beiden Krankheitszustände. Auf experimentellem Wege hat man dadurch entsprechende Kontraste in der Wirkung der Schilddrüse hervorgerufen, daß man den Versuchstieren auf verschiedene Weise Schildrüsensubstanz zuführte, sowie durch Thyrektomie. Da man es als entschieden ansehen muß, daß die Parathyreoiden Organe mit spezifischer Funktion sind, sucht man sie bei der Exstirpation zu schonen; dies ist um so notwendiger, als verschiedene Untersucher nachgewiesen zu haben glauben, daß sie umgekehrt wie die Schilddrüse auf den Kohlenhydratstoffwechsel wirken.

Die älteren klinischen Untersuchungen bestanden gewöhnlich in der Bestimmung der Assimilationsgrenze für Traubenzucker. Bei Basedowscher Krankheit wurde alimentäre Glucosurie in 60% der Fälle von Chvostek nachgewiesen; Strauß[3]) fand sie bei 16%, während Naunyn[4]) nur in einem Falle alimentäre Zuckerausscheidung im Urin sah; dies ist

[1]) Diese Zeitschr. **58**, 472, 1914.

[2]) Zeitschr. f. klin. Med. **66**, 1, 1908; **67**, 380, 1909. — Verhdl. d. 25. Kongr. f. inn. Med. **1908**, 345.

[3]) Deutsche med. Wochenschr. **1897**, 275, 309.

[4]) Der Diabetes mellitus **1906**, 2. Aufl., S. 99.

um so merkwürdiger, als die Untersuchung eine große Anzahl Fälle von Basedow umfaßte. Die Untersuchungen beweisen, daß bei dieser Krankheit die Glucosurie nach Traubenzucker mit sehr wechselnder Häufigkeit auftritt und daß ihr keine größere Bedeutung beigemessen werden kann. Die Erklärung für diese Erscheinung fand man allmählich dadurch, daß es sich zeigte, daß auch gesunde Personen nach derselben Menge Traubenzucker Glucosurie bekamen.

Schulze[1]) hat die Toleranz der Basedow-Patienten gegenüber Zucker + Adrenalin vor und nach der Operation untersucht. Während die Patienten vor der Operation nach 100 g Traubenzucker + 0,3 mg Adrenalin Glucosurie bekamen, rief dieselbe Probe nach der Operation keine Zuckerausscheidung hervor. Aus klinischen Erfahrungen kann im übrigen angeführt werden, daß man nach dem Gebrauch von Schilddrüsentabletten oft Glucosurie, bisweilen auch echten Diabetes gesehen hat, und daß Basedow-Patienten oft diabetische Symptome aufweisen. Bei Myxödem hat v. Noorden[2]) eine ungewöhnlich hohe Assimilationsgrenze für Zucker nachgewiesen; bei anderen Gelegenheiten ist Glucosurie beschrieben worden, die nach Gebrauch von Schilddrüsentabletten (Gordon[3]) zurückging.

Indessen ist Glucosurie nicht immer ein Anzeichen veränderten Kohlenhydratstoffwechsels; sie kann durch eine Veränderung in der Permeabilität für Zucker bedingt sein; hierfür ist Phlorizinglucosurie ein deutliches Beispiel.

In den letzten Jahren hat man deshalb seine Zuflucht zu Blutzuckerbestimmungen genommen. Diese Methode ist jedoch noch nicht bedenkenfrei ausgebildet; in der Regel hat man nur die Veränderungen des Blutzuckers in ein oder zwei Proben bestimmt; dies aber ist selbstverständlich unzulänglich, um möglichen Veränderungen in allen Einzelheiten zu folgen.

Nach den vorliegenden Untersuchungen scheint spontane Hyperglykämie bei Hyperthyreoidismus selten zu sein. Forsbach und Severin[4]) haben einen Fall bei Basedow, Flesch[5]) keinen unter 40 Untersuchten.

Ich selbst habe in Prof. Borelius' Klinik zu Lund zwei Fälle von Basedow untersucht. Bei beiden wurde Hyperglykämie (0,165 und 0,17 %) durch Bangs Mikromethode bestimmt. Dagegen kann oft alimentäre Hyperglykämie nachgewiesen werden. Nach 100 g Dextrose fand Flesch nach 1 Stunde Hyperglykämie in 61 %. Die höchste Steigerung des Blutzuckers war 0,45 %, am häufigsten aber betrug der Blutzuckergehalt

[1]) Beiträge z. klin. Chir. 82, 207, 1913.
[2]) Die Zuckerkrankheit 1912, 6. Aufl., S. 52.
[3]) Zit. nach Lépine, „Le diabète sucré". 1909, 330.
[4]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 75, 168, 1914.
[5]) Beiträge z. klin. Chir. 82, 237, 1913.

weniger als 0,20% und blieb also innerhalb der physiologischen Grenzen, die Jacobsen[1]) bei Gesunden nach 100 g Dextrose gefunden hat. Dazu kommt, daß Flesch in zwei Fällen von Myxödem eine ähnliche alimentäre Steigerung wie bei Morbus Basedowii hat nachweisen können.

Von experimentellen Untersuchungen haben in letzter Zeit besonders die Eppingers, Faltas und Rudingers[2]) große Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Bei thyrektomierten Hunden fanden sie eine bedeutende Herabsetzung des Hungereiweißstoffwechsels. Adrenalin, subcutan und interperitoneal in Dosen eingespritzt, die bei normalen Tieren immer wirken, riefen keine Glucosurie hervor; dagegen konnten sie mit Schilddrüsensubstanz und Adrenalin Glucosurie hervorrufen. Die Assimilationsgrenze für Zucker war erhöht. Wurde das Pankreas 1 bis 2 Wochen nach der Schilddrüse exstirpiert, so hatte der darauffolgende Diabetes nachstehende Besonderheiten: Hungereiweißstoffwechsel nur in geringem Grade erhöht, während er nach reiner Pankreasexstirpation um das 3 bis 4fache zunimmt. Bei gleichzeitiger Exstirpation der Schilddrüse und des Pankreas war im Anfange der Hungereiweißstoffwechsel ebenso groß wie nach alleiniger Entfernung des Pankreas; allmählich nahm er ab. Der Quotient D:N hielt sich hoch.

Die Wechselwirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel zwischen den verschiedenen endokrinen Organen macht der Verfasser durch das folgende Schema anschaulich.

Wie man sieht, ist die Hypophyse nicht mit in das System aufgenommen worden. Die Schilddrüse wirkt in zwei Richtungen, sowohl auf die Nebennieren als auch auf das Pankreas.

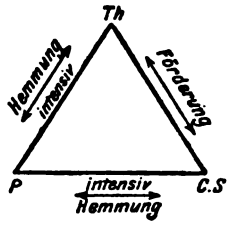


Fig. 1.

Underhill und Hilditch[3]) haben jedoch die Veränderung der glucosurischen Wirkung des Adrenalins nach Thyrektomie nicht bestätigen können. Pick und Pineles[4]) konnten auch bei Kaninchen nach Thyrektomie keinen veränderten Adrenalineffekt nachweisen, dagegen aber bei jungen Ziegen. Endlich wäre zu

[1]) Diese Zeitschr. 56, 471, 1913.
[2]) a. a. O.
[3]) Amer. Journ. of Physiol. 25, 66, 1909/10.
[4]) Diese Zeitschr. 12, 473, 1908.

erwähnen, daß Gley[1]) nach Injektion von Schilddrüsenextrakt keine erhöhte Adrenalinproduktion nachweisen konnte, ebenso wie die Nebennieren thyrektomierter Kaninchen eine normale Menge Adrenalin enthielten.

Diese Beispiele aus der reichhaltig vorliegenden Literatur zeigen, daß fortgesetzte Untersuchungen erforderlich sind. Ein Mangel dieser experimentellen Untersuchungen ist, daß keine Blutzuckerbestimmungen gemacht worden sind. Aus diesem Grunde bin ich gern Prof. Bangs Aufforderung gefolgt, eine neue experimentelle Bearbeitung des Stoffes mit Hilfe seiner neuen Mikromethode für Blutzuckeranalysen vorzunehmen als Fortsetzung der systematischen Durcharbeitung der Bedeutung der endokrinen Drüsen für den Kohlenhydratstoffwechsel, der hier geplant ist.

Die Untersuchungen zerfallen ungezwungen in zwei Teile.

1. Der unmittelbare Einfluß der Schilddrüse auf den Blutzucker,

2. ihre Beziehungen zu anderen für den Zuckerstoffwechsel wichtigen Organen.

Beide Momente sind in ihrem Verhältnis zum Hyperthyreoidismus und Athyreoidismus zu untersuchen.

In den folgenden Untersuchungen bin ich diesem Plan gefolgt; doch habe ich von den Beziehungen zwischen der Schilddrüse und den übrigen endokrinen Organen nur Schilddrüse-Nebennieren und Schilddrüse-Hypophyse geprüft.

Als Versuchstiere habe ich in allen Fällen Kaninchen verwandt. Die Blutzuckerbestimmungen sind mit Bangs Mikromethode[2]) ausgeführt. Die Versuchsanordnung im übrigen wird später besprochen werden.

Der unmittelbare Einfluß der Schilddrüse auf den Blutzucker.

Um diesen zu untersuchen, habe ich geprüft, ob Hyperthyreoidismus und Athyreoidismus den Blutzuckergehalt verändern.

1. Hyperthyreoidismus und Blutzucker.

Nach subcutaner und intravenöser Einspritzung von 50% Schilddrüsenextrakt (Parke Davis & Co.) habe ich keine Veränderung im Blutzucker nachweisen können. Als Beispiele führe ich folgende Versuche an.

---

[1]) Archives Internationales de Physiol. 14, 152, 175, 1914.

[2]) Diese Zeitschr. 57, 300, 1913.

Kaninchen Nr. . .	1	2	
Gewicht in g . . .	1800	2700	
Extrakt in ccm . .	1[1])	5[2])	
Blutzucker . . .	0,13%	0,13%	
Nach 1 Stunde . .	0,15%	0,13%	Urinzucker
„ 2 Stunden .	0,14%	0,13%	
„ 3 „ .	0,15%	0,13%	
„ 4 „ .	0,13%	0,13%	
„ 5 „ .	0,12%	0,13%	

Die geringe Steigerung von 0,13 bis 0,15% im Versuch 1 liegt innerhalb der Fehlergrenzen der Methode und ihr kann deshalb keine Bedeutung beigemessen werden. Es kann indessen zweifelhaft sein, ob der Extrakt die wirksamen Stoffe enthält. Tägliche Injektionen von großen Dosen (12 ccm im Laufe von 4 Tagen) riefen nämlich keinen Gewichtsverlust hervor, was Fütterung mit entsprechenden Mengen von Schilddrüsentabletten immer tut. Kloses[3]) Untersuchungen mit Schilddrüsenpreßsaft haben auch gezeigt, daß die wirksamen Substanzen leicht zerstört werden. Bei einigen Versuchen habe ich deshalb die Wirkung von Tabletten geprüft. Diese wurden entweder per os von 0,5 bis 1 g Drüsensubstanz zugeführt oder in Ringerscher Flüssigkeit aufgelöst, subcutan und intravenös injiziert. Bei Zuführung per os wird der Blutzucker nicht verändert und selbst bei 5 bis 6tägiger Verabreichung ist der Blutzucker unverändert. Subcutane Injektionen haben nur ausnahmsweise eine Erhöhung des Blutzuckerprozentsatzes hervorgerufen. Die Untersuchungen scheinen die klinische Erfahrung zu stützen, daß bei Morbus Basedowii spontane Hyperglykämie selten ist. Auf experimentellem Wege hat Klose[4]) nach intravenöser Injektion von Basedow-Strumapreßsaft konstant Hyperglykämie erhalten; ob Saft normaler Schilddrüsen auf dieselbe Weise wirkt, wird nicht angegeben.

2. Hypothyreoidismus und Blutzucker.

Methodik. Der Blutzucker wurde vor und nach Thyrektomie bei im ganzen 10 Tieren untersucht. Bei der Operation

[1]) Intravenöse Injektion.
[2]) Subcutane Injektion.
[3]) Ergebnisse der inneren Medizin **10**, 167, 1913.
[4]) a. a. O. S. 254.

wurden die unteren Parathyreoiden nicht entfernt. Nach der Operation wurden die Tiere 14 Tage im Laboratorium gehalten, bevor die nächste Untersuchung stattfand. In dieser Zeit heilten die Wunden in allen Fällen per primam und die Tiere waren scheinbar von dem operativen Eingriff vollständig unberührt geblieben. Nach Abschluß der Untersuchungen habe ich mich bei der Sektion davon überzeugt, daß keine Schilddrüsenreste mehr da waren. Es zeigt sich, daß Thyrektomie den Blutzucker nicht verändert. Die nachweisbaren Schwankungen sind bei der von Zeit zu Zeit stattfindenden Untersuchung nicht größer als bei normalen Tieren. Folgende Beispiele mögen angeführt werden; die Blutzuckerbestimmungen sind 2 Tage nacheinander in Doppelproben gemacht worden.

Vor	der	Operation	.	.	.	.	0,17% 0,13%
2	Wochen	nach	der	Operation		.	0,12% 0,13%
3	„	„	„	„		.	0,13% 0,14%
6	„	„	„	„		.	0,10% 0,11%
10	„	„	„	„		.	0,12% 0,13%
14	„	„	„	„		.	0,10% 0,12%

Der Wert 0,17% fand sich bei der ersten Untersuchung des Tieres und beruht wahrscheinlich auf psychischer Einwirkung.

Schilddrüse und Adrenalin.

In der Literatur findet man häufig angeführt, daß die Schilddrüse die Wirkung des Adrenalins auf den Blutzucker erhöht. Man sollte in diesem Falle stärkere Wirkung der Adrenalininjektion während des Hyperthyreoidismus, schwächere bei Hypothyreoidismus erwarten. Zur Beurteilung der Adrenalinwirkung zu verschiedenen Zeitpunkten ist es natürlich notwendig, die Variationen der Blutzuckerkurve nach Adrenalin bei normalen Tieren zu untersuchen. Außer der Höhe der Hyperglykämie muß man auch ihre Dauer berücksichtigen. Bei der Untersuchung einer großen Anzahl normaler Tiere habe ich gefunden, daß nach subcutanen Adrenalininjektionen große individuelle Variationen ihrer Wirkung auftreten. Sogar Tiere vom selben Körpergewicht können äußerst verschieden reagieren. Einige sind für Adrenalin sehr sensibel, andere für dieselben Dosen relativ refraktär. Man kann deshalb von der Wirkung bei einem Tier nicht auf die bei anderen schließen.

Auch dasselbe Tier reagiert zu verschiedenen Zeiten etwas verschieden auf Adrenalin. Die Variationen sind hier jedoch meist klein und erklären sich teilweise dadurch, daß das Adrenalin bei subcutaner Injektion verschieden schnell resorbiert wird. In einigen Fällen scheint bei den Tieren Gewöhnung einzutreten; aber das ist selten.

Folgende Kurve mag über die Variation der Adrenalinhyperglykämie bei wiederholten Injektionen von Adrenalin orientieren.

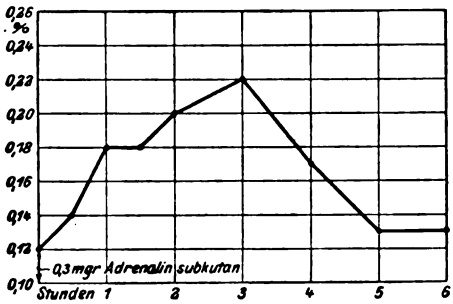


Fig. 2a. 14. XII. 1918.

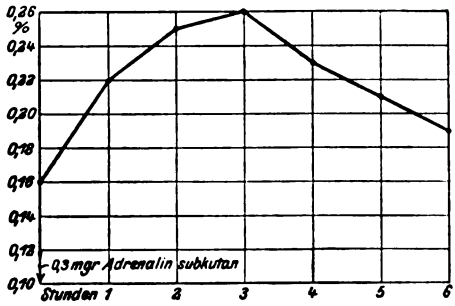


Fig. 2b. 8. I. 1914.

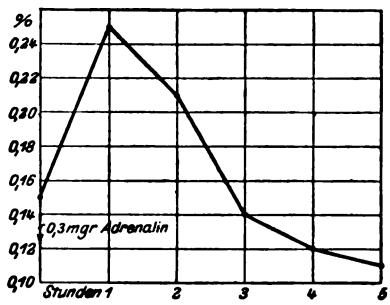


Fig. 2c. 1. III. 1914.

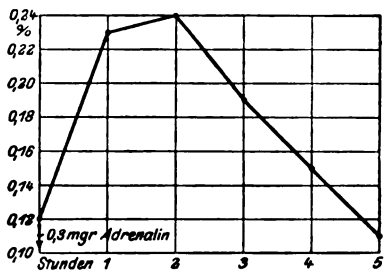


Fig. 2d. 8. III. 1914.

Fig. 2. Die Blutzuckerkurven nach subcutaner Injektion von 0,3 mg Adrenalin bei denselben Tieren.

Für vergleichende Versuche über die Adrenalinwirkung ist es also durchaus notwendig, Versuche an denselben Tieren vorzunehmen, doch kann kleinen Verschiedenheiten keine Bedeutung beigemessen werden.

1. Hyperthyreoidismus und Adrenalin.

Da Schilddrüsenextrakt bei Kaninchen nur wenig auf den Stoffwechsel einwirkt, habe ich zu den Versuchen Schilddrüsentabletten verwandt. Meist habe ich die Adrenalinwirkung nach

5 bis 6tägiger Fütterung mit 0,50 bis 1,00 g Schilddrüse per Tag geprüft; bei einigen Versuchen habe ich pulverisierte Tabletten intravenös injiziert und gleichzeitig eine subcutane Injektion von Adrenalin gegeben. Meine Versuche ergaben, daß die Adrenalinhyperglykämie bei Schilddrüsensubstanz nicht erhöht wird.

Die Adrenalinwirkung ist entweder unverändert geblieben oder ein wenig größer oder — und zwar meist — geringer gewesen als die normale Reaktion des Tieres. In Fig. 3 ist ein Versuch angeführt; vgl. auch die Adrenalinkurven in Fig. 6.

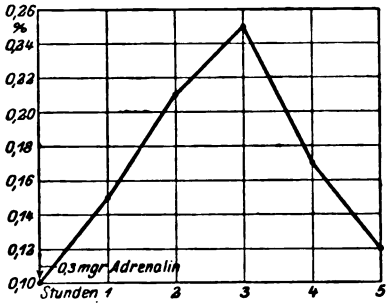


Fig. 3a. 7. III. 1914. Vor Fütterung mit Schilddrüsensubstanz. Gewicht des Tieres 2900 g.

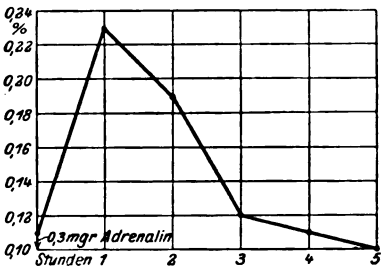


Fig. 3b. 19. III. 1914. Nach Fütterung mit 4 g Schilddrüsensubstanz im Laufe von 6 Tagen. Gewicht des Tieres 2400 g.

Fig. 3. Adrenalinhyperglykämie vor und nach Fütterung mit Schilddrüsensubstanz.

2. Hypothyreoidismus und Adrenalin.

Wird die Wirkung subcutaner Adrenalininjektionen vor und nach Thyrektomie untersucht, so kann auch nach Ent-

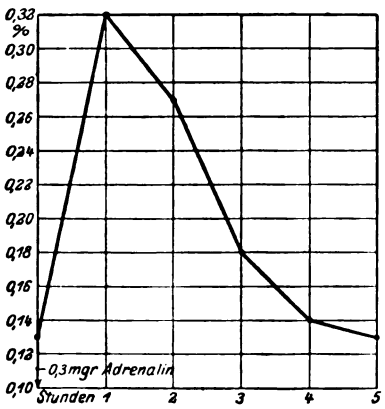


Fig. 4a. Vor Thyrektomie untersucht.

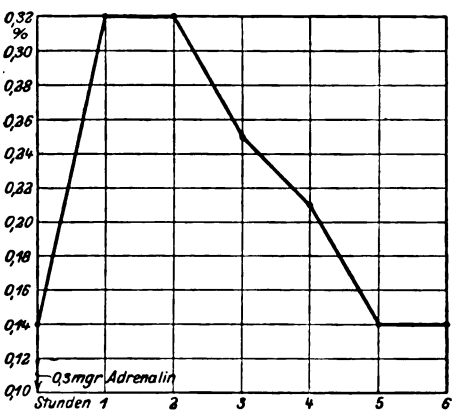


Fig. 4b. 8 Tage nach Thyrektomie.

fernung der Schilddrüse keine schwächere Wirkung nachgewiesen werden. Selbst so kleine Dosen wie 0,1 mg rufen deutliche Hyperglykämie hervor, und diese ist nach 0,3 mg durchgehends ebenso stark wie vor der Operation. Auch die Glucosurie nimmt also nicht ab, wie Eppinger, Falta und Rudinger[1]) es bei Hunden gefunden haben. In den folgenden Kurven ist ein Versuch als Beispiel aufgeführt; die übrigen Versuche an insgesamt 10 Tieren stimmen mit diesem überein.

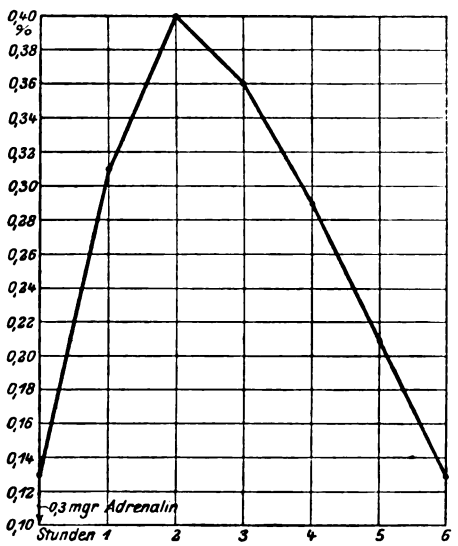


Fig. 4c. 16 Tage nach Thyrektomie.

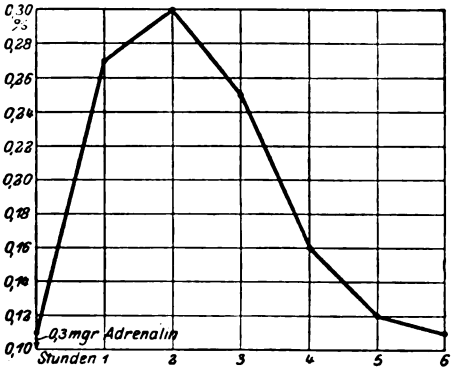


Fig. 4d. 48 Tage nach Thyrektomie.

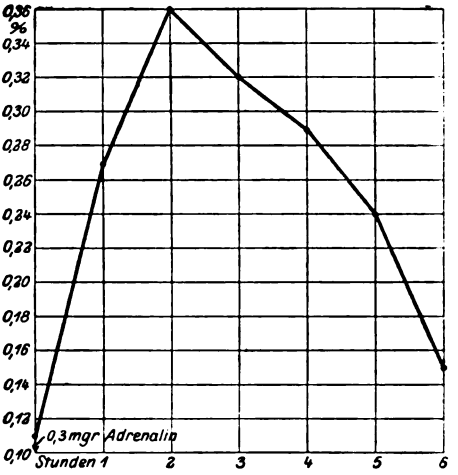


Fig. 4e. 76 Tage nach Thyrektomie.

Fig. 4. Adrenalinwirkung vor und nach Thyrektomie.

Es könnte möglicherweise gegen die Beweiskraft der Versuche eingewendet werden, daß die Schilddrüse nicht vollständig entfernt gewesen sei. Sektionen mit kontrollierender mikro-

[1]) a. a. O.

skopischer Untersuchung haben aber gezeigt, daß die Thyrektomie geglückt und die unteren Parathyreoiden an ihrem Platz waren.

Schilddrüse und Pituitrin.

Da es sich bei meinen Versuchen gezeigt hat, daß das Adrenalin durch das Vorhandensein oder Fehlen der Schilddrüse nicht beeinflußt wird, lag es nahe zu prüfen, ob auch die Wirkung des Pituitrins bei Hyperthyreoidismus und Athyreoidismus sich gleich blieb. Zuerst wurde die Wirkung des Pituitrins an einer Reihe normaler Tiere bestimmt. Die Versuchsanordnung war: am einen Tage wurde Pituitrin + Adrenalin injiziert, am folgenden nur Adrenalin. Das Pituitrin wurde

Fig. 5a. 23. und 24. I. 1914.

Fig. 5b. 2. und 8. II. 1914.

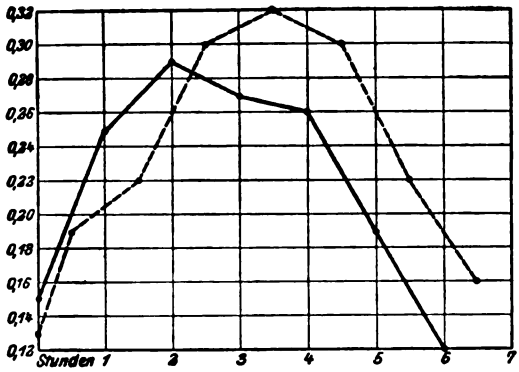


Fig. 5c. 21. und 22. II. 1914.

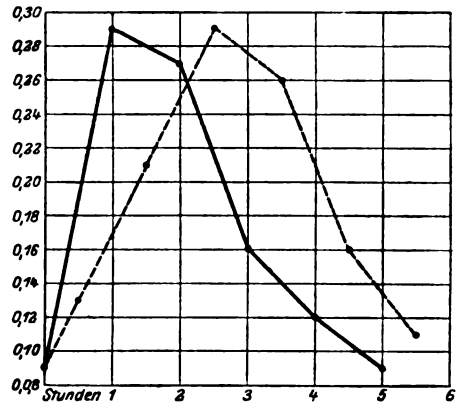


Fig. 5d. 12. und 13. III. 1914.

Fig. 5. Die hemmende Wirkung des Pituitrins auf Adrenalin bei denselben Tieren.
—— Blutzucker nach Adrenalin.
—— Blutzucker nach Pituitrin + Adrenalin.

bei allen Versuchen $^1/_2$ Stunde vor dem Adrenalin injiziert. Der Unterschied zwischen den Blutzuckerkurven stellt die Wirkung des Pituitrins auf Adrenalinhyperglykämie dar.

Stenströms[1]) Untersuchungen zufolge heben 2 bis 3 ccm Pituitrin in der Regel die Wirkung von 0,1 mg Adrenalin auf. Bei den kleinen Pituitrindosen, die ich meist verwandt habe, kann man deshalb nur unbedeutende Hemmungen mittlerer Dosen Adrenalin (0,3 mg) erwarten. Dies ist auch in der Regel der Fall; indessen zeigen verschiedene Tiere auch vor dem Gebrauch des Pituitrins ungleiche Empfindlichkeit. Dagegen reagiert dasselbe Tier ziemlich konstant. Die absolute Höhe der Kurven kann variieren; die Beziehung zwischen der Adrenalin- und der Adrenalin- + Pituitrinkurve zeigt aber kleine Variationen bei denselben Tieren.

Vorstehende Kurven mögen also Beispiele dienen.

1. Hyperthyreoidismus und Pituitrin.

Injektion des obenerwähnten Schilddrüsenextrakts verändert die Wirkung des Pituitrins nicht. Bei den Versuchen wurde der Extrakt in Dosen von 1 bis 5 ccm subcutan 1 Stunde vor dem Hauptversuch injiziert. In einigen Fällen

[1]) a. a. O. S. 474.

wurden dem Versuchstiere mehrere Tage lang 3 ccm Extrakt eingespritzt, worauf die Reaktion auf Adrenalin und Pituitrin untersucht wurde. Diese war bei allen Versuchen unverändert. Dagegen kann nach Fütterung mit Schilddrüsentabletten eine typische Änderung der Wirkung des Pituitrins nachgewiesen werden. Dies zeigen zum Beispiel folgende Versuche.

Bei diesen Versuchen wurden 2 bis 5 ccm Pituitrin zu 0,3 mg Adrenalin verwandt, so daß eine deutliche Hemmung der Adrenalinhyperglykämie nachgewiesen werden konnte. Darauf bekamen die Tiere im Laufe einer Woche Schilddrüsentabletten in Dosen von

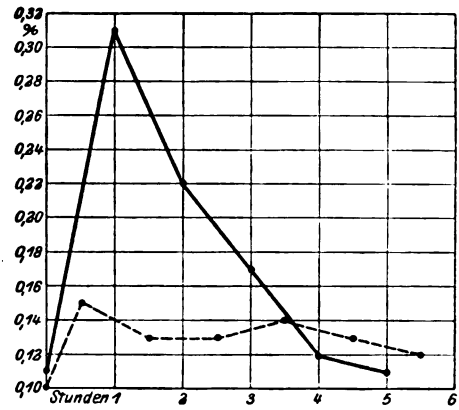


Fig. 6a. 9. III. 1914. Vor Fütterung. Gewicht des Tieres 2450 g.

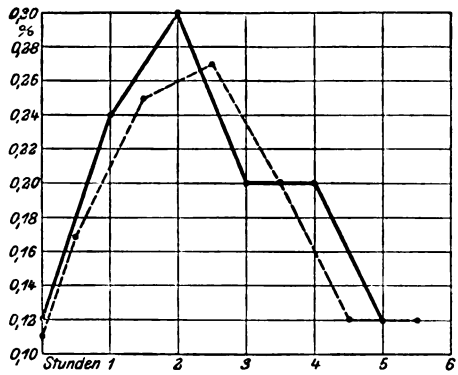


Fig. 6b. 17. III. 1914. Nach Fütterung mit 4 g Schilddrüsensubstanz im Laufe von 6 Tagen. Gewicht des Tieres 2000 g.

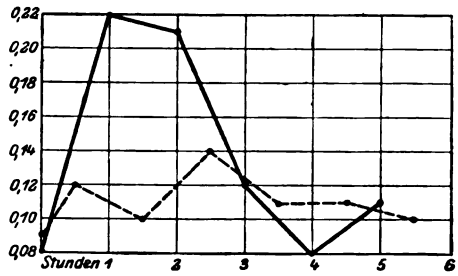


Fig. 6c. 26. III. 1914. Schilddrüsenfütterung. Seponiert seit 15. III. 1914. Gewicht des Tieres 2000 g.

Fig. 6. Wirkung des Pituitrins nach Fütterung mit Schilddrüsensubstanz.
—— 0,3 mg Adrenalin.
—— 5 ccm Pituitrin + 0,3 mg Adrenalin.

0,5 bis 1 g, wonach der Versuch wiederholt wurde. Aus den in Fig. 6 wiedergegebenen Kurven geht deutlich hervor, daß diese Fütterung die Wirkung des Pituitrins verändert. Bei

diesem Versuch haben 5 ccm Pituitrin vor der Fütterung bei der gewählten Versuchsanordnung die nach 0,3 mg Adrenalin eingetretene Adrenalinhyperglykämie fast ganz aufgehoben. 4 g Schilddrüsensubstanz per os sind imstande, den hemmenden Einfluß des Pituitrins ganz bedeutend abzuschwächen.

Wird nun ein paar Wochen, nachdem man mit der Schilddrüsenfütterung aufgehört hat, wieder untersucht, so zeigen sich die Verhältnisse ganz wie vor der Fütterung: das Pituitrin hemmt stark. Meine übrigen Versuche weisen dasselbe Ergebnis auf. Man ist deshalb berechtigt, zu folgern: Die Fütterung mit Schilddrüsentabletten schwächt den hemmenden Einfluß des Pituitrins auf die Adrenalinhyperglykämie ab.

2. Hypothyreoidismus und Pituitrin.

Die obigen Versuche haben gezeigt, daß zwischen Schilddrüsensubstanz und Pituitrin ein Antagonismus besteht.

Wenn dies auf einer verschiedenen physiologischen Funktion von Schilddrüse und Neurohypophyse beruht, müßte man die hemmenden Eigenschaften des Pituitrins dadurch erhöhen können, daß man die Schilddrüse entfernt. Um dies zu prüfen, habe ich die Wirkung des Pituitrins nach Thyrektomie bei 12 Kaninchen untersucht; von diesen sind jedoch nur 10 auch vor der Operation geprüft worden. Die Versuchsanordnung war wie oben beschrieben; den einen Tag Injektion von Pituitrin + Adrenalin, am folgenden nur von Adrenalin. Bei diesen Versuchen habe ich kleine Dosen Pituitrin, 1,5 ccm, verwandt, die im allgemeinen nur geringen Einfluß auf die Adrenalinhyperglykämie nach 0,3 mg Adrenalin haben (vgl. für die erwähnten Normalversuche Fig. 5.) Bei der Untersuchung der Pituitrinwirkung vor und nach Thyrektomie kann man in den allermeisten Fällen eine bedeutende Erhöhung der hemmenden Wirkung des Pituitrins nach der Operation nachweisen. Die folgenden Kurven, Fig. 7 und 8, z. B. zeigen dies.

Bei den Versuchen sind die Tiere erst 14 Tage nach der Operation untersucht worden; sie sind von ihr scheinbar vollständig unberührt geblieben. Die Veränderungen des Pituitrineffekts können deshalb nicht dem operativen Eingriff zugeschrieben werden. Von 10 Tieren habe ich bei 9 verschiedene Zeit nach der Operation eine stark erhöhte

Wirkung der verwandten kleinen Pituitrinmengen nachweisen können. Die Intensität der Hemmung ist um das 3 bis 4fache erhöht worden. 1,5 ccm Pituitrin wirkt ebenso stark wie sonst 5 ccm (vgl. Fig. 6) auf dieselben Dosen Adrenalin. Bei der Fortsetzung systematischer Untersuchungen der thyreopriven Tiere zeigte es sich, daß die intensive Wirkung des Pituitrins nach und nach abnimmt und sich nach einigen Monaten wie vor der Entfernung der Schilddrüse stellt.

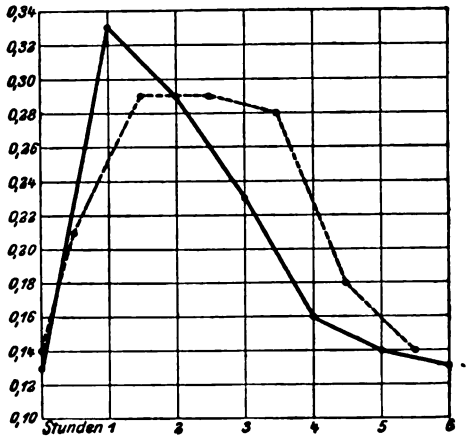


Fig. 7a. Vor Operation untersucht.

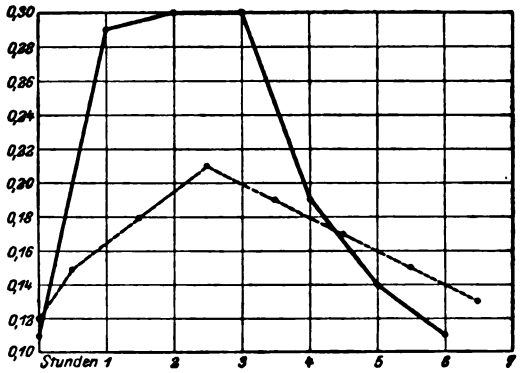


Fig. 7b. 2 Wochen nach Operation.

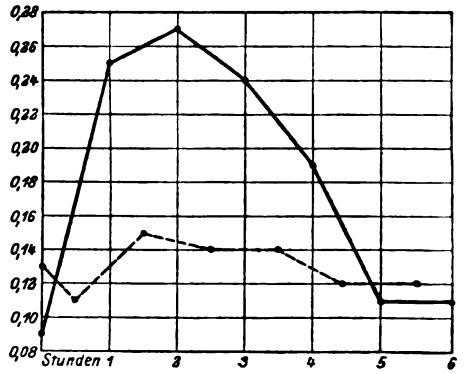


Fig. 7c. 3 Wochen nach Operation.

Fig. 7. Pituitrinwirkung vor und nach Thyrektomie.
—— Blutzucker nach 0,3 mg Adrenalin.
---- Blutzucker nach 1,5 ccm Pituitrin + 0,3 mg Adrenalin.

Für die Wirkung der Thyrektomie ist das in Fig. 7 angeführte Beispiel typisch. 2 Wochen nach der Operation wirkt das Pituitrin entschieden stärker als vorher; die Wirkung war nach 3 Wochen noch stärker erhöht. 1,5 ccm Pituitrin vermag da die Wirkung des Adrenalins (0,3 mg) fast aufzuheben. In einzelnen Fällen kann jedoch diese intensive Hemmung erst nach 5 bis 6 Wochen nachgewiesen werden. Dies beruht wahr-

scheinlich darauf, daß das Schilddrüsenhormon verschieden lange im Organismus zirkuliert, bevor es ausgeschieden wird. Die Erfahrungen betreffs des Einflusses der Schilddrüsenfütterungen auf das Körpergewicht stützen dies. Man kann nämlich bei den Tieren einen weiteren Gewichtsverlust hervorrufen, nachdem man mit der Fütterung aufgehört hat; erst nach einigen Wochen beginnt das Gewicht wieder zuzunehmen, obgleich die Tiere sonst gut fressen und keine Krankheitssymptome zeigen. Möglich ist natürlich auch, daß in einzelnen Fällen kleine Schilddrüsenreste bei der Operation zurückgeblieben sind; diese können für kurze Zeit in gewissem Grade die exstirpierte Drüse ersetzen, aber erleiden dann Atrophie. Gleichzeitig kann man die Veränderungen der Pituitrinwirkung nachweisen. Wie oben erwähnt, habe ich nur in einem Falle die Veränderungen des Pituitrineffekts nach Thyrektomie nicht nachzuweisen vermocht; es ist jedoch möglich, daß auch dieses Tier ebenso wie die übrigen reagiert hat, daß aber die Veränderung früher eingetreten ist und von so kurzer Dauer war, daß sie schon aufgehört hatte, als die Untersuchung nach Thyrektomie vorgenommen wurde. In diesem Falle wurde nämlich das Tier erst nach 3 Wochen untersucht. Bei Sektion 6 Wochen nach der Operation waren keine Reste der Schilddrüse nachzuweisen, wie auch keine akzessorischen Drüsen. Dagegen fand sich dieselbe Veränderung der Hypophyse wie bei den übrigen thyrektomierten Tieren, bei denen die starke Hemmung nachgewiesen und wieder ausgeglichen worden war. Dies wird unten behandelt werden.

Werden die Tiere mit Schilddrüsensubstanz gefüttert, wenn die starke Pituitrinwirkung nachweisbar ist, so wird diese schnell aufgehoben. Einige Zeit nach dem Aufhören der Fütterung ist die intensive Hemmung wieder nachweisbar. In den folgenden Kurven ist ein Beispiel angeführt.

Es läßt sich also ein Antagonismus zwischen der Schilddrüse und dem Pituitrin sowohl bei Hyperthyreoidismus als auch bei Hypothyreoidismus nachweisen. Erhöht sich die Schilddrüsenwirkung, so nimmt die des Pituitrins ab; schwächt sich die Schilddrüsenwirkung ab, so kann eine starke Erhöhung der Pituitrinwirkung nachgewiesen werden.

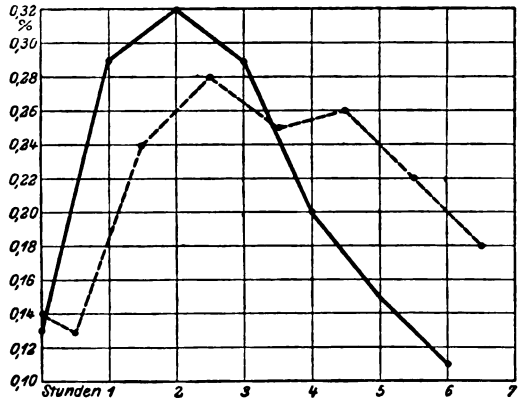


Fig. 8a. Vor Operation.

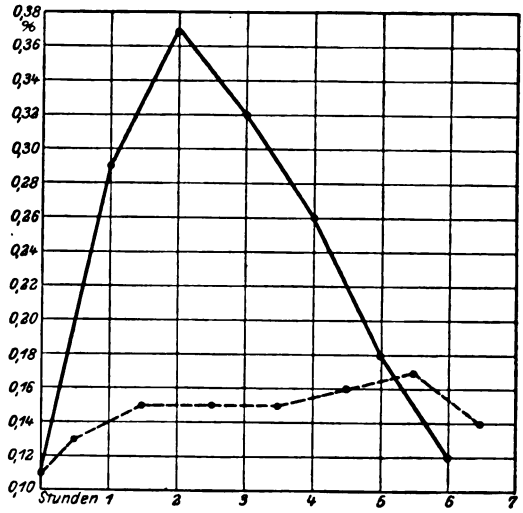


Fig. 8b. Nach 2 Wochen.

Der Verlauf der Wirkung des Pituitrins nach Thyrektomie, zuerst nämlich eine starke Erhöhung, die nach und nach wieder bis zum Normalen abnimmt, deutet darauf hin, daß es sich hier um Phänomene handelt, die eine unmittelbare Folge davon sind, daß ein antagonistisch wirkendes Organ entfernt worden ist. Der Organismus verfügt aber augenscheinlich über Mittel, durch die die Wirkung der Entfernung der Schilddrüse auf den Blutzucker ausgeglichen werden kann. Auf alle Fälle zeigen meine Untersuchungen, daß die Veränderung der Pi-

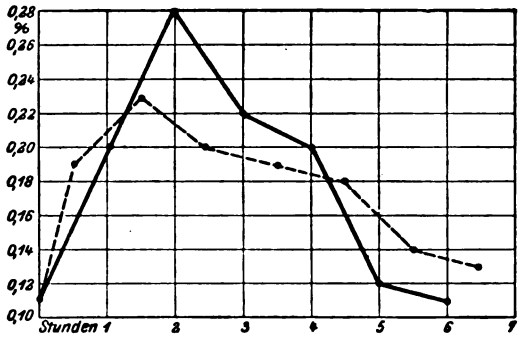


Fig. 8c. Nach 3 Wochen.
3. Woche Fütterung mit 2,5 g Schilddrüsensubstanz.

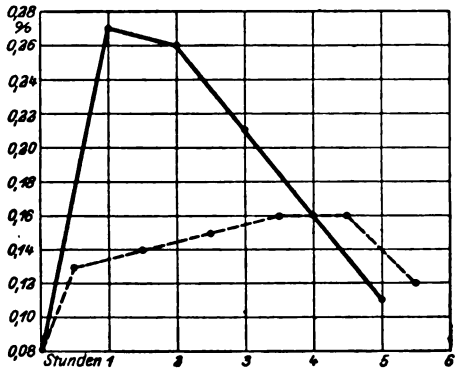


Fig. 8d. Nach $4^1/_2$ Wochen Schilddrüsenfütterung, seponiert seit $1^1/_2$ Woche.

Fig. 8. Pituitrinwirkung nach Thyrektomie und darauf folgender Fütterung mit Schilddrüsensubstanz.
—— Blutzucker nach 0,3 mg Adrenalin.
---- Blutzucker nach 1,5 ccm Pituitrin + 0,3 mg Adrenalin.

tuitrinwirkung vorübergehend ist; nach einigen Monaten sind die Verhältnisse in der Regel dieselben wie vor der Thyrektomie. Die Frage ist dann, auf welche Weise der normale hemmende Einfluß der Schilddrüse auf das Pituitrin ersetzt werden kann. Es mag in erster Reihe davon gesprochen werden, daß die Parathyreoiden die Funktion der Schilddrüse übernehmen können. Dieser Meinung ist auch Swale Vincent[1]). Die meisten Fachschriftsteller meinen jedoch, daß die Parathyreoiden Organe sind, die eine der Schilddrüse entgegen-

[1]) Internal secretions and the ductless glands **1912**, 337.

gesetzte Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben (Eppinger, Falta, Rudinger[1]). Ich habe diese Frage nicht untersucht; es mag nur erwähnt werden, daß ich bei meinen Fällen keine nachweisbare Hypertrophie der Parathyreoiden nach Thyrektomie gefunden habe. Es ist jedoch mißlich, Hypertrophie von Organen nachzuweisen, die normal nur 8 bis 10 mg wiegen. Dagegen habe ich in einigen Fällen die Veränderungen der Hypophyse nach Thyrektomie untersucht.

3. Der Einfluß des Hypothyreoidismus auf die Hypophyse.

Die Hypophyse bei Kaninchen wiegt 20 bis 25 mg. Ihr vorderster glandulärer Teil wird embryonal aus einer Ausbuchtung der Mundschleimhaut angelegt, während ihr hinterer nervöser Teil, der mit dem Gehirn in Verbindung steht, ektodermalen Ursprungs ist. Der vorderste epitheliale Teil besteht aus drei Arten Zellen: a) chromophile Zellen mit eosinophilen und basophilen Granula, die teils durch Eosin, teils durch basische Farbstoffe stark gefärbt werden; b) chromophobe Zellen ohne deutliche Granula. Der hintere Teil besteht hauptsächlich aus Neuroglia. Zwischen beiden befindet sich eine Epithelschicht, die auch endodermalen Ursprungs ist und als Pars intermedia bezeichnet wird. Zwischen dem vordersten und dem mittleren Teil erstreckt sich ein kolloidgefüllter Hohlraum, Ratkes Cyste; kleinere Kolloidansammlungen können im Pars intermedia normal nachgewiesen werden.

Nach Thyrektomie hypertrophiert die Hypophyse. Rogowitch[2]) hat dies zuerst nachgewiesen, und spätere Untersucher, wie Stieda[3]), Hofmeister[4]), Gley[5]) u. a., haben die Richtigkeit bestätigt.

Bei Kaninchen ist die Hypertrophie sehr bedeutend. Gley hat dergestalt 1 Jahr nach der Thyrektomie eine vielfache Gewichtsvermehrung nachweisen können. Rogowitch zufolge erleidet nur der vorderste Teil der Hypophyse spezielle Ver-

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 67, 380, 1909.
[2]) Archives de Physiologie 1888, 419.
[3]) Zieglers Beiträge 7, 535, 1889.
[4]) Fortschr. d. Med. 10, 81, 121, 1892.
[5]) Compt. rend. Soc. Biol. 1892, 666.

änderungen; Herring[1]) und Biedel[2]) meinen dagegen, daß es der mittlere und hintere Teil sei. Ich habe bei einigen meiner Versuchstiere das Gewicht der Hypophyse und die anatomische Struktur nach Thyrektomie untersucht. Bei der mikroskopischen Untersuchung habe ich die Hypophyse in Serien (5 μ) geschnitten und die Schnitte teils mit Hämatoxylin und Eosin, teils nach Mallory[3]) gefärbt; besonders die letztere Färbung liefert hübsche Differentiation der verschiedenen Teile und Zellentypen. Das Ergebnis der bisher vorgenommenen Untersuchungen ist in Kürze folgendes. Beim Wiegen kann in den Fällen deutliche Hypertrophie der Hypophyse nachgewiesen werden, in denen die stark hemmende Wirkung des Pituitrins wieder kompensiert ist. Bei einem $3^1/_2$ Monate nach der Thyrektomie untersuchten Tiere wog demgemäß die Hypophyse 50 mg, d. h. das Doppelte des gewöhnlichen Gewichts. Dagegen habe ich keine deutliche Hypertrophie nachweisen können, wenn die Tiere zu einer Zeit seziert wurden, in der die starke Pituitrinwirkung vorhanden war. Bei einem Tiere, bei dem die Veränderung des Pituitrineffekts erst nach 5 Wochen nachweisbar war, wog demgemäß die Hypophyse nur 25 mg. Die mikroskopische Untersuchung zeigt, daß die Hypertrophie durch eine Volumenerhöhung des vordersten Teiles bewirkt ist. Die Zellenanordnung ist dieselbe wie bei normalen Hypophysen. Eine vermehrte Kolloidbildung habe ich nicht finden können. Um die Frage zu entscheiden, ob der vorderste Teil der Hypophyse ein Reserveorgan ist, das nach Thyrektomie entwickelt wird und die Schilddrüse ersetzt, dürfte es jedoch nötig sein, ihre Wirkung auf das Pituitrin zu untersuchen. Solche Untersuchungen liegen betreffs des Blutzuckers nicht vor. Dagegen wirken Extrakte des vordersten Teiles anders auf den Blutdruck als solche des mittleren. Biedl[4]) führt z. B. an, daß Injektion von Extrakt des vordersten Hypophysenteils den Blutdruck verringert, während das Pituitrin ihn bekanntlich vermehrt. Man ist jedoch nicht berechtigt, daraus zu schließen, daß die Wir-

[1]) Quarterly journal of experim. Physiology 1, 281, 1908.

[2]) Innere Sekretion 2, 106, 1913.

[3]) Schmorl, Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden, 4. Aufl., 1907, S. 240.

[4]) Innere Sekretion 2, 140, 1913.

kung auf den Blutzucker auch antagonistisch ist; hierfür ist die Wirkung des Adrenalins und Pituitrins ein Beispiel. Beides erhöht den Blutdruck, wirkt aber höchst verschieden auf den Blutzucker. Weitere Untersuchungen im hiesigen Institut werden hoffentlich in dieser Frage Klarheit bringen.

Ergebnisse der Versuche.

Das Ergebnis der im vorigen Abschnitt mitgeteilten Untersuchungen ist in Kürze folgendes:

1. Hyperthyreoidismus und Athyreoidismus verändern den normalen Blutzuckerwert bei Kaninchen nicht.

2. Die Schilddrüse verändert die Wirkung des Adrenalins auf den Blutzucker nicht.

3. Dagegen hemmt die Schilddrüse die Wirkung des Pituitrins auf die Adrenalinhyperglykämie. Bei Hyperthyreoidismus wird der hemmende Einfluß des Pituitrins auf Adrenalin abgeschwächt, bei Athyreoidismus wird er vermehrt.

4. Einige Monate nach Thyrektomie kann eine bedeutende Gewichtsvermehrung der Hypophyse nachgewiesen werden. Im Verlaufe derselben Zeit wird auch die verringerte Schilddrüsenwirkung auf Pituitrin kompensiert. Die bisher vorgenommenen anatomischen Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Kompensation gleichzeitig mit der Hypertrophie des glandulären Teils der Hypophyse eintritt; dieses Organ stellt deshalb möglicherweise eine Reserve für die Schilddrüsenwirkung auf den Blutzucker dar.

Vorstudien über Gicht. III.

Von

H. Bechhold und J. Ziegler.

(Mit Unterstützung der Neubürger-Stiftung zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 15. April 1914.)

Mit 1 Figur im Text.

Im Verlauf unserer früheren Studien[1]) war eine Reihe neuer Fragen aufgetaucht, deren Beantwortung wir uns zum Ziel setzten. Wenn es uns erst jetzt nach über 3 Jahren möglich ist, die Ergebnisse zu veröffentlichen, so liegt es daran, daß Hunderte von Versuchen, die nach älteren unzulänglichen Methoden angestellt waren, verworfen und neue Methoden ausgearbeitet werden mußten, daß durch eine subtile Sterilisationstechnik große Serummengen während je $1^1/_2$ Monaten derart zu dialysieren waren, daß sie sich noch nach Monaten als steril erwiesen, kurz, daß die Schwierigkeiten der Versuchstechnik, die aus dem Folgenden kaum erkenntlich sein werden, erst überwunden werden mußten, ehe wir mit gesicherten Resultaten hervortreten konnten.

Wenn trotzdem die Daten nicht die Konstanz und Sicherheit haben, die bei Lösungen von einheitlicher chemischer Zusammensetzung üblich sind, so liegt dies daran, daß eben biologische Flüssigkeiten wie Serum keine konstante chemische Zusammensetzung haben, sondern nach Herkunft variieren. Immerhin aber ist die Tatsache, daß wir von zwei verschiedenen Seiten zu annähernd gleichen Resultaten kamen, ein Beleg für die Richtigkeit unserer Ergebnisse.

---

[1]) Bechhold und Ziegler, Vorstudien über Gicht. I. Diese Zeitschr. **20**, 189 bis 214; do. II. diese Zeitschr. **24**, 146 bis 151.

Vor allem schien es uns wichtig, festzustellen, welcher Anteil den Kolloiden bei der Lösung von Harnsäure und Uraten im Blutserum zufällt.

Um die Löslichkeit einer Substanz zu bestimmen, kann man zwei Wege einschlagen: Man kann sie so lange mit dem Lösungsmittel in Berührung lassen, bis nichts mehr in Lösung geht, oder man kann die Substanz in dem Lösungsmittel (bei Gegenwart von Keimen) entstehen lassen. Die Gewichtsbestimmung der gelösten Substanz oder des Bodenkörpers ergibt dann die Löslichkeit. Auf unser Problem angewandt: Man kann Mononatriumurat durch Schütteln in der Flüssigkeit (z. B. bei 37°) lösen oder man kann es sich ausscheiden lassen, indem man eine bei 60° oder höher gesättigte Lösung herstellt, die man auf 37° abkühlt und mit Mononatriumuratkeimen versetzt. Ein weiterer Weg ist der, daß man so viel Harnsäure mit der zur Bildung von Mononatriumurat genau berechneten Menge NaOH oder Na_2CO_3 in Lösung zusammenbringt, als zur Bildung einer übersättigten Lösung erforderlich ist.

Methodik.

Schüttelmethode. Bei den Versuchen zu unserer früheren Publikation[1]) waren wir in der Weise vorgegangen, daß wir verschiedene Gewichtsmengen des zu lösenden Stoffes mit dem Lösungsmittel unter ruhiger Durchmischung in Berührung brachten und die Menge bestimmten, die nach längerer Zeit gerade vollkommen in Lösung ging. — Das Charakteristische dieser Methode bestand darin, daß relativ große Mengen Substanz mit entsprechend großen Mengen des Lösungsmittels (jedesmal 200 ccm Serum) bis zu 24 Stunden in Berührung kamen, daß jedoch eine weitgehende Dispersion (Zersplitterung) durch sehr heftige Mischung vermieden wurde.

Bei unseren späteren Versuchen wurden im Vorversuch 10 ccm Flüssigkeit mit dem ca. 10fachen Überschuß an Harnsäure bzw. NaHU versetzt und im Schüttelapparat digeriert. Bei den Hauptversuchen wurden 100 ccm Lösungsmittel in gleicher Weise behandelt. — Die Bestimmung der gelösten Harnsäure bzw. des NaHU erfolgte meist in der Weise, daß

[1]) Bechhold und Ziegler, diese Zeitschr. 20, 194.

die eingebrachte Uratmenge vorher genau gewogen war. Nach Beendigung des Versuchs wurde sowohl der ungelöste Rückstand wie auch der Teil, der in Lösung ging, nach der an anderer Stelle beschriebenen Zieglerschen Methode[1]) bestimmt.

In Vorversuchen wurde festgestellt, nach welcher Zeit ein Maximum gelöst war; in den meisten Fällen und wo nichts Gegenteiliges gesagt ist, war dies bereits nach einer Stunde erreicht.

Bei der Schüttelmethode hängt natürlich alles von einer scharfen Trennung des Lösungsmittels vom zu lösenden Stoffe ab, was in dem vorliegenden Falle, nämlich bei Gegenwart von Kolloiden, nichts weniger als einfach ist. Wir erreichten dies teils durch Zentrifugieren bei über 6000 Umdrehungen in der Minute, teils vermittels Filtration durch Schleicher & Schüll'sche Filter, die Blutkörperchen zurückhalten. Die einwandfreie Trennung wurde durch mikroskopische Prüfung kontrolliert, bei der Uratpartikelchen im Dunkelfeld oder nach Anfärbung mit basischen Farbstoffen deutlich hervortreten.

Es braucht kaum besonders hervorgehoben zu werden, daß alle Maßnahmen im Ostwaldschen Wasserbad, einige bei 18°, die meisten bei 37° erfolgten, nachdem vorher Gefäße und Lösungen auf 18 bzw. 37° gebracht waren. Als Gefäße wurden nur ausgedämpfte Schottsche Gläser verwandt.

Die Methode der Abscheidung eines festen Körpers aus gesättigter bzw. übersättigter Lösung. — Die Abkühlung aus einer bei höherer Temperatur gesättigten Lösung ist möglich bei Wasser als Lösungsmittel, während bei Albuminlösungen wegen der Gefahr der Koagulation Beschränkungen geboten sind. — Da Harnsäure in Wasser weniger löslich ist als Mononatriumurat, so kann man hier mit NaOH oder Na_2CO_3 keine übersättigten Lösungen erzielen, wohl aber ist dies möglich in eiweißhaltigen Lösungen. Bei wässerigen Lösungen sollte man von beiden Seiten das gleiche Lösungsgleichgewicht erreichen. Inwieweit dies bei einem kolloidhaltigen Lösungsmittel (Serum bzw. Serumeiweiß) zutrifft, war eine Frage, auf die wir unsere Aufmerksamkeit lenkten.

[1]) J. Ziegler, Münchn. med. Wochenschr. **1913**, Nr. 20, S. 1083.

Die Bestimmung der Uratlöslichkeit.

Bei der zuerst beschriebenen Methode ergibt sich der Uratgehalt von selbst. Habe ich eine Reihe von Gläsern mit z. B.

0,1 g NaHU . . . . . alles gelöst,
0,2 „ „ . . . . . „ „ ,
0,3 „ „ . . . . . kleiner Bodensatz,
0,4 „ „ . . . . . stärkerer Bodensatz,

so enthält die Lösung:

$> 0{,}2$ g und $< 0{,}3$ g NaHU.

Bei den Versuchsreihen, bei denen mit Überschuß von Harnsäure bzw. NaHU geschüttelt wurde, mußte der Uratgehalt der Lösung oder des nicht in Lösung gegangenen Bodensatzes bestimmt werden. Bei wässerigen Lösungen eignet sich dazu sehr gut die Titration mit Permanganat. Es verbrauchen 1 mg Harnsäure 0,266 ccm $^{n}/_{20}$- und 1 mg NaHU 0,235 ccm $^{n}/_{20}$-Permanganat.

Bestimmung der Urate in eiweißhaltigen Lösungen.

Die Bestimmung von Uraten in eiweißhaltigen Flüssigkeiten war bisher mit derartigen Fehlern verknüpft, daß sie für unsere Zwecke unbrauchbar war. Man mußte einen Unsicherheitskoeffizienten von 20 bis 30% zuschlagen, um zu annehmbaren Werten zu gelangen. — Bei den geringen Uratmengen, die sich in eiweißhaltigen Flüssigkeiten lösen, wären unsere Versuche gescheitert, wenn es nicht dem einen von uns (Ziegler) gelungen wäre, in Fortbildung der Krüger-Schmidtschen Methode ein Verfahren auszuarbeiten, das die Bestimmung von Uraten mit einem maximalen Fehler von 10% und einem durchschnittlichen Fehler von 3,5 % ermöglicht und die quantitative Bestimmung von nur 0,1 mg in 10 ccm Rinderserum gestattet[1]). — Die Methode ist beschrieben in der Münchner med. Wochenschr. 1913, Nr. 20. Sie besteht im wesentlichen darin, daß harnsaures Kupferoxydul in alkalischer Lösung ausgeflockt wird, wobei das Eiweiß nicht koaguliert.[2])

[1]) Alle Versuche zur Bestimmung der Urate unter vorheriger Enteiweißung gaben unbefriedigende Resultate.

[2]) Auf die Fehlresultate, die Sack, Berlin, II. med. Klinik, mit meiner Methode erhalten hat, werde ich demnächst ausführlicher an anderer Stelle antworten. (Ziegler.)

Die Methode ist für „Rinderserum" ausprobiert und gibt nur brauchbare Resultate, wenn das Serum absolut frei von Hämolyse und Formelementen ist.

Um den bis jetzt, beim Vergleich mit der wässerigen Lösung, noch unvermeidbaren Fehler von ca. $-10\,\%$ nach Möglichkeit auszuschalten, wurde neben dem Permanganattiter für 0,01 Harnsäure bzw. 0,01 Mononatriumurat in Wasser gelöst, immer noch der Titer bestimmt, der sich ergab, wenn 0,01 Harnsäure bzw. 0,01 NaHU in Serum gelöst und nach vorerwähnter Methode als harnsaures Kupferoxydul ausgeflockt wurde. Die Fehlergrenze sinkt dann auf rund $\pm$ 3,5 %. Letzterer Titer wurde allen mit dem gleichen Serum angestellten Versuchen zur Berechnung zugrunde gelegt. Also beispielsweise:

Titer für 0,01 Harnsäure gelöst in 10 ccm H_2SO_4 = 5,0 ccm $KMnO_4$.
„ „ 0,01 „ „ „ 10 „ Rinderserum = 4,8 ccm $KMnO_4$.

Danach gelten 4,8 ccm $KMnO_4$ = 0,01 Harnsäure für die Berechnung der Werte bei den weiteren Versuchen mit dem gleichen Serum.

Dialyse des Serums.

Da bei der Löslichkeit von Harnsäure und NaHU in Serum die Salze einen erheblichen Einfluß haben und da es uns besonders darum zu tun war, festzustellen, welchen Anteil die Kolloide bei der Lösung der Urate haben, so bemühten wir uns, eine möglichst aschearme Eiweißlösung herzustellen, bei der besonders das Na ausgeschaltet ist, denn gerade die Gegenwart von Na konnte die Löslichkeit von NaHU beeinflussen. Zu dem Zweck wurden je 100 ccm Serum mit 4,3 ccm Normal-Salzsäure versetzt (ein solches Serum ist gegenüber Lackmus neutral) und 14 Tage lang dialysiert, anfangs in gewöhnlichem, später in destilliertem Wasser; das Wasser wurde täglich erneuert. Bei der Dialyse wurde größter Wert auf vollkommene Sterilität gelegt. Wasser und Gefäße waren sterilisiert. Das Serum war sterilisiert, indem es 1 Stunde auf 58° erhitzt und dann 24 Stunden zum Auskeimen der Sporen im Brutschrank gehalten wurde; dies wurde je 3 mal wiederholt. Die Dialyse erfolgte in Fischblasen, die mit Äther entfettet und mit 1 ‰

Sublimat durchgespült waren; über dem Wasser war eine Toluolschicht. Nach 14 Tagen Dialyse wurde das Serum von dem ausgeschiedenen Globulin abfiltriert, wieder wie oben sterilisiert und zu je 100 ccm Serum 2 ccm 11 %iges KCl gesetzt, um die eventuell noch vorhandenen Na-Salze durch K zu verdrängen; nach ca. 14 Tagen war im Außenwasser kein Cl mehr nachweisbar und das Serum zeigte in der Bunsenflamme nicht mehr die Na-Gelbfärbung, sondern eine Färbung, die wohl hauptsächlich von Ca herrührt. Derart behandeltes Serum war noch nach über 12 Monaten steril.

Das in der Lösung enthaltene Eiweiß (Trockensubstanz) besaß schließlich noch einen Aschengehalt von 1,014 % (Mittel aus zwei Analysen). Die Asche enthielt hauptsächlich Ca, das nach Rona[1]) wahrscheinlich als Eiweißcalciumverbindung im Serum enthalten ist. Es war somit der ursprüngliche Aschengehalt auf etwa den 17. Teil vermindert. — Es sei übrigens betont, daß sich die Resultate mit einem so behandelten Serum nicht wesentlich von denen unterschieden, die man mit einem Serum erzielte, das so lange dialysiert war, bis im Außenwasser kein Cl mehr nachweisbar war.

Bei dieser Behandlung verdünnt sich das Serum außerordentlich, so daß es schließlich einen Eiweißgehalt von 1,66 % bis 2,5 % hat. Um den Kolloidgehalt auf das ursprüngliche Maß zu bringen, muß es deshalb im Vakuum wieder auf einen Gehalt von 7,6 % Eiweiß konzentriert werden. Es ist alsdann der normale Globulingehalt durch den entsprechenden Albumingehalt ersetzt. Welchen Einfluß dies hat, ergibt sich aus S. 482.

Wässerige Lösungen.

Die wässerigen Lösungen von Harnsäure sind durch die Untersuchungen von His und Paul, sowie von Gudzent bekannt. — Es lösen sich bei 37° im Liter 64,9 mg = 1 : 15505.

Mononatriumurat.

Löst man Mononatriumurat durch Schütteln in Wasser, so nimmt nach Gudzent[2]) seine Löslichkeit allmählich ab; sie beträgt

	bei 18°	bei 37°
frisch	1 : 846	1 : 469
nach Erreichung des Löslichkeitsminimums	1 : 1270	1 : 710

[1] Rona und Takahashi, diese Zeitschr. 49, 370 bis 380.
[2]) Vgl. dazu Schade, Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 379.

Anders gestaltet sich der Vorgang, wenn man die Löslichkeit nach Abkühlung einer gesättigten NaHU-Lösung bestimmen will. — Die Neigung des Mononatriumurats zur Bildung „übersättigter" Lösungen ist eine sehr große, und die Zeit, die zur Bildung von Krystallen erforderlich ist, sehr lang.

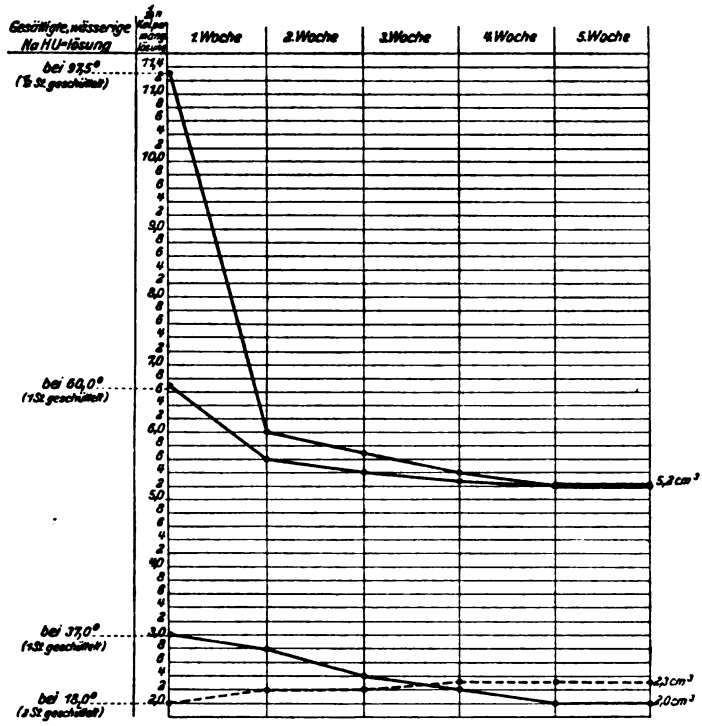


Fig. 1. Sämtliche Lösungen wurden 5 Wochen lang bei 18° C gehalten (bei Gegenwart von Bodenkörper). Am Ende jeder Woche wurde durch Titrieren der Gehalt der Lösungen an Mononatriumurat bestimmt. Je 10 ccm der klarfiltrierten Lösungen wurden titriert.

Stellt man sich eine durch $^1/_2$ stündiges Schütteln bei 97° gesättigte NaHU-Lösung her, die auf 208 Gewichtsteile Wasser 1 Teil NaHU enthält, und filtriert sie durch ein dichtes Filter, so kann man die Lösung oft 1 Woche und länger bei Zimmertemperatur aufheben, ohne daß sich Urat ausscheidet. Kühlt man eine solche Lösung auf 0° ab, so wird sie erst nach $^1/_2$ Stunde milchig und es fällt ein amorpher Niederschlag aus. — Die Lösung über dem Niederschlag ist aber noch immer stark

übersättigt; sie enthält 1 NaHU: 222 Wasser (statt 1: > 1200) und nach weiteren 24 Stunden bei 0° noch 1: 520.

Eine bei 60° gesättigte und auf Zimmertemperatur abgekühlte Lösung wird erst nach 15 Stunden bei zeitweisem Umschütteln durch Keime zur Krystallisation veranlaßt. Eine bei 37° gesättigte und auf 18° abgekühlte NaHU-Lösung zeigt bei Zusatz von Keimen unter zeitweisem Umschütteln erst nach 48 Stunden Beginn einer Ausscheidung, die sich in den nächsten Tagen vermehrt.

Wie langsam die Übersättigung abnimmt, zeigt vorstehende Kurve, die dadurch gewonnen wurde, daß das jeweilig in Lösung verbliebene Urat mit $^n/_{20}$-Kaliumpermanganatlösung titriert wurde. 1 ccm Permanganatlösung entspricht 0,004241 g NaHU.

Die Berechnung der Anfangs- und Endzahlen ergibt folgende Löslichkeitsverhältnisse:

	NaHU : Wasser	5 Wochen lang auf 18° abgekühlt NaHU : Wasser	
1. Bei 97,5°	1: 208	1: 454	statt 1:1270.
2. „ 60°	1: 352	1: 454	
3. „ 37°	1: 786	1:1179	
4. „ 18°	1:1179	1:1026	

Einige andere Reihen ergaben:

5. Bei 100°	1:190	nach 10 Tagen	1:925	bei 18°	statt 1:1270.
6. „ 97,5°	gesättigt	„ 8 Tagen	1:444	„ 18°	
7. „ 60°	„	„ 9 Tagen	1:640	„ 18°	
8. „ 37°	„	„ 7 Tagen	1:965	„ 18°	

Wir sehen aus der Kurve, daß bei 60° und mehr Veränderungen des Urats in Lösung vor sich gehen, die seine Rückkehr zu normalen Löslichkeitswerten stark beeinflussen. — Damit erklärt es sich auch, daß diese Rückkehr nicht gleichmäßig erfolgt (vgl. 1. mit 5. und 6., und 2. mit 7.), sondern von der Dauer der Erwärmung abhängt (1. und 2. waren je $^1/_2$ Stunde erwärmt, 5., 6. und 7. nur 15 Minuten lang).

Läßt man jedoch bei 37° gesättigte NaHU-Lösung sich auf 18° abkühlen, so erhält man Löslichkeitswerte, die sich denjenigen ziemlich nähern, die durch Schütteln, also von der andern Seite, erhalten werden.

Die kolloide Lösung von Mononatriumurat.

In einer trefflichen Arbeit über die „Anomalie der Harnsäurelöslichkeit" ist es Schade und Boden[1]) gelungen, hoch übersättigte Lösungen von Mononatriumurat herzustellen, aus denen sie das Mononatriumurat in Form von Gallerten abscheiden konnten. In überzeugender Beweisführung suchen die Verf. darzulegen, daß zwischen der „Zone der wahren Lösung" und der „Zone der Ausfällung" noch eine „Zone der kolloiden Phase" liegen müsse, eine Annahme, die wir bereits in unserer ersten Arbeit[2]) angedeutet haben, indem wir von „der vielleicht kolloiden Lösung des Überfüllungszustandes" sprachen. — Uns ist es nun vermittels der Methode der Ultrafiltration gelungen, die Existenz kolloider Lösungen von Mononatriumurat experimentell nachzuweisen[3]).

Eine Lösung von Harnsäure in $^n/_{10}$-Natronlauge wurde nach Schade und Boden[4]) hergestellt. Es wurden 2,5 g Harnsäure gelöst, wozu ca. 153 ccm $^n/_{10}$-NaOH erforderlich waren; die Lösung zeigte noch eine leichte Rosafärbung durch das Phenolphthalein und schwache Opalescenz.

145 ccm dieser Lösung kamen bei ca. 35° in den Bechholdschen Ultrafiltrationsapparat und wurden bei 3 Atm. mit

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 347 bis 380.

[2]) Diese Zeitschr. 20, 205.

[3]) In der „Zeitschr. f. physiol. Chemie" 89, S. 253 u. 254 (1914) veröffentlicht Gudzent eine Arbeit, in welcher er schreibt, daß es ihm nicht gelang, durch Ultrafiltration kolloide Harnsäure in Lösung nachzuweisen. U. E. liegt es ganz in dem Belieben des Untersuchers, ob er kolloides NaHU finden wird oder nicht. Denn im Augenblick des Entstehens befindet sich das NaHU offenbar in molekularer Verteilung; bis zur Erstarrung vergehen mehrere Stunden. In der Zwischenzeit treten die Molekeln zu größeren Komplexen zusammen, die schließlich eine Größe erreichen, welche man als das Stadium der „kolloiden" Lösung bezeichnen wird. Ultrafiltriert man kurz nach der Herstellung, so wird man kein kolloides NaHU nachweisen können; wartet man jedoch einige Zeit, so erhält man Befunde in der Art des obigen.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 352, 1913.

Stickstoff durch ein $7^1/_2$ %iges Ultrafilter gedrückt. Die Filtration ging sehr rasch vor sich (ca. 50 ccm in ca. 8 Minuten).

Die ersten 16 ccm des Filtrats wurden verworfen.

Die folgenden 39 ccm Filtrat wurden untersucht.

Das Filtrat war weniger opalescent und weniger rosa gefärbt als die Ausgangslösung. Der Filterrückstand (60 ccm) war etwas stärker opalescent und erheblich stärker rot gefärbt als die Ausgangslösung. Mikroskopisch ließ sich keinerlei Ausscheidung nachweisen.

Orginallösung, Filtrat und Filterrückstand waren noch 1 Stunde nach der Filtration unverändert und zeigten keine Ausscheidung festen Urats oder Änderung der Opalescenz. — Ca. 4 Stunden nach der Filtration hatte sich in den 3 Flaschen festes Urat ausgeschieden. Man konnte jedoch einen deutlichen Unterschied erkennen: Der Filterrückstand war zu einer ziemlich festen Masse erstarrt, die das Ganze durchsetzte; das Filtrat bestand aus einem festen Bodenkörper, über dem Flüssigkeit stand; die Originallösung hatte in der Konsistenz mehr Ähnlichkeit mit dem Filtrat, war aber dicker.

Schon vor dem Erstarren war ein Teil jeder Lösung auf das 3fache mit Wasser verdünnt worden. Der Gehalt dieser Lösungen wurde durch Titration mit $^n/_{10}$-Kaliumpermanganat bestimmt.

Es verbrauchten			$^n/_{10}$-Permanganat (Mittel aus 3 Bestimmungen)
10 ccm	Originallösung	(3 fach verdünnt) . . .	8,35 ccm
10 „	Filterrückstand	„ „ . . .	9,48 „
10 „	Filtrat	„ „ . . .	7,1 „

Die Orginallösung enthielt somit in jenem Stadium, in dem filtriert wurde, rund 15 % kolloides Mononatriumurat in Lösung und wurde durch Ultrafiltration auf rund 25 % angereichert.

Die Löslichkeit von Harnsäure und Urat in den einzelnen Bestandteilen des Serums.

Salzfreie Serumalbuminlösung.

Löslichkeit von Harnsäure bei 37°. Eiweißgehalt 7,6 %[1]). Schüttelzeit 1 Stunde.

[1]) Pauli und Samec fanden in einer salzfreien Serumalbuminlösung mit 2,23 % Albumingehalt eine Löslichkeit von 570 mg Harnsäure in 1000 ccm.

Anfangslöslichkeit (sofort nach dem Schütteln): Mittel aus 7 Versuchen 668 mg im Liter gleich 1:1497.

Endlöslichkeit (nach 2 mal 24 Stunden bzw. 11 mal 24 Stunden): Mittel aus 2 Versuchen 549 mg im Liter gleich 1:1820.

Löslichkeit von Mononatriumurat bei 37°.

Die Löslichkeit wurde von zwei Seiten bestimmt:

1. durch Schütteln von NaHU in der salzfreien Serumalbuminlösung,

2. durch Bildung von überschüssigem NaHU in der salzfreien Serumalbuminlösung.

1. Löslichkeit durch Schütteln: bei Schütteln während 24 Stunden in der Lösung wurden folgende Werte erhalten:

bei einem Gehalt von 4,52% Serumalbumin
625 mg im Liter gleich 1:1600,
bei einem Gehalt von 7,6% Serumalbumin
476 mg im Liter gleich 1:2100;

2. durch Bildung von überschüssigem Mononatriumurat. Es wurde zu dem Zweck salzfreies Serum mit 7,6% Eiweiß mit Harnsäure gesättigt und die zur Bildung von Mononatriumurat äquivalente Menge $NaHCO_3$ beigefügt[1]). Nach 24 Stunden beginnen sich bei Gegenwart von Keimen geringe Mengen Urat auszuscheiden, und die Lösung enthält alsdann

568 mg NaHU im Liter gleich 1:1760.

Eine Veränderung des Uratgehalts bei längerem Stehen erfolgt nicht.

Die Serumsalze und das Globulin.

Die folgenden Untersuchungen hatten den Zweck, festzustellen, welchen Anteil an den Serumbestandteilen bei der Lösung der Urate das Globulin hat. Da Globulin nur bei Gegenwart von Salzen löslich ist, so mußten auch diese in das Bereich der Untersuchung gezogen werden.

Gudzent[2]) hat seiner Zeit die Löslichkeit von Mono-

[1]) Durch Zusatz von NaOH kann man kein NaHU entstehen lassen. Es treten Veränderungen ein, infolge deren auch bei großen Harnsäuremengen keine NaHU-Ausscheidung erfolgt.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**, 466.

natriumurat in sogenanntem künstlichen Serum festgestellt. Es ist dies eine von Adler angegebene Mischung anorganischer Salze, die qualitativ und quantitativ im wesentlichen die gleiche Zusammensetzung hat wie die Serumsalze; da beim Zusatz des $NaHCO_3$ zu den übrigen Salzen Carbonate ausfallen, so setzen Adler und Gudzent Zucker und Gummi arabicum, also ein Kolloid zu, um das Ausfallen zu verhindern. Wir haben die Löslichkeit des Mononatriumurats in der Adlerschen Mischung (ohne Zucker und Gummi arabicum) nachgeprüft. Ferner haben wir die Serumkrystalloide uns durch 5 tägige Dialyse aus Serum gewonnen, sie auf das ursprüngliche Volumen eingedampft und diese Flüssigkeit zur Lösung von NaHU verwandt, in der Voraussetzung, daß möglicherweise noch andere krystalloide Bestandteile des Serums für die Lösung des NaHU in Frage kommen.

Dabei ergaben sich folgende Zahlen für die Löslichkeit des Mononatriumurats bei 37° (durch Schütteln während 24 Stunden), Mittel aus 2 Versuchen:

Adlersche Salzmischung (ohne Zucker und Gummi)	171 mg	im	Liter	gleich	1 : 5850,
nach Gudzent	71 „	„	„	„	1 : 14100,
Serumsalze durch Dialyse gewonnen	70 „	„	„	„	1 : 14300.

Diese durch Dialyse gewonnenen Serumsalze haben wir nun zur Lösung von Globulin[1]) verwandt und darin NaHU durch Schütteln bei 37° gelöst. Wir stellten eine Lösung mit 3,08% Globulin her, also mit dem Gehalt, in dem es im Serum enthalten ist. Die durch Schütteln während 24 Stunden ermittelte Löslichkeit von NaHU bei 37° betrug (2 Versuche)

20 bis 25 mg im Liter gleich 1 : 40 000 bis 1 : 50 000.

Aus der Gesamtheit dieser Daten erkennen wir, daß unter den kolloiden Bestandteilen des Serums hauptsächlich das Globulin für die Verminderung der Löslichkeit des NaHU im Serum verantwortlich ist.

---

[1]) Auch wenn das Globulin ganz frisch war, war eine klare Lösung desselben in den Serumsalzen nicht zu erzielen, offenbar ist dazu noch die Gegenwart des Albumins erforderlich.

Man kann schließlich noch folgenden Versuch machen: Man vereinigt gleiche Volumina einer 4,52%igen salzfreien Serumalbuminlösung, gesättigt mit Mononatriumurat, mit einer Lösung von Globulin in den Blutserumsalzen und konzentriert diese Mischung im Vakuum auf das halbe Volumen. Man hat alsdann ein normales Serum mit einem Gehalt von 645 mg NaU im Liter. Wie zu erwarten, scheidet diese Lösung bei Gegenwart von Keimen reichlich Mononatriumurat aus.

Löslichkeit von Harnsäure in Serum (undialysiert) bei 37°.

Löst man Harnsäure in Serum, so setzt sie sich mit den Carbonaten um und es entsteht Mononatriumurat, das sich ausscheidet. Die Ausscheidung erfolgt jedoch ziemlich langsam, und man kann sich, wenn man den Vorgang nicht zeitlich verfolgt, leicht Täuschungen über die Aufnahmefähigkeit des Serums für Harnsäure hingeben. Nachstehende Tabelle mag den Vorgang veranschaulichen:

Nach 1 Std. Schütteln enthalten 1000 ccm Serum 1,95 g Harnsäure = 1 : 512,

nach 2 Std. Schütteln enthalten 1000 ccm Serum 2,18 g Harnsäure = 1 : 459,

nach 3 Std. Schütteln enthalten 1000 ccm Serum 2,27 g Harnsäure = 1 : 440,

nach 4 Std. Schütteln enthalten 1000 ccm Serum 1,91 g Harnsäure = 1 : 524.

Wir sehen somit, daß zwischen der 3. und 4. Stunde ein Maximum an Uraten im Serum vorhanden ist und daß dann die Ausscheidung von NaHU beginnt. Der Mechanismus dieser Reaktion ist vom physiko-chemischen Standpunkt äußerst interessant und verdiente ein näheres Studium, doch mußten wir zunächst von dieser Aufgabe absehen. Es liegt hier eine Zeitreaktion vor; nur fragt es sich, ob diese lediglich in der Ausscheidung des NaHU zu suchen ist oder in der Reaktion zwischen der Harnsäure und dem $NaHCO_3$[1]).

[1]) Vgl. A. Thiel, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**, 867 ff.

Löslichkeit von Mononatriumurat in Serum (undialysiert)[1]).

A. Schüttelmethode.

1 l Serum enthielt bei 1stündigem Schütteln bei 37°

nach 1 Std. bei 37° 230 mg NaHU oder 1:4350 } 6 Wochen
„ 24 „ „ 37° 230 „ „ „ 1:4350 } altes steriles
„ 2×24 „ „ 37° 229 „ „ „ 1:4370 } Serum;

gleiches Resultat nach 7 und 14 Tagen.

Nach 1 Std. bei 37° 268 mg NaHU oder 1:3730 } frisches steriles
„ 24 „ „ 37° 245 „ „ „ 1:4080 } Serum;

gleiches Resultat nach 3×24 Std.

Mittelwert aus 5 Versuchen:

Anfangslöslichkeit . . . . 270,5 mg im Liter gleich 1:3703,
Endlöslichkeit (nach Erreichung des Lösungsminimums) . 255 „ „ „ „ 1:3921.

B. Bei der Bildung durch Lösen von Harnsäure in Serum.

1 l Serum enthielt nach 1stündigem Schütteln bei 37°

nach 1 Std. bei 37° 1,7 g Harnsäure od. 1,92 g gebild. NaHU entspr. 1:521 NaHU,
„ 24 „ „ 37° 0,330 g „ od. 0,373 g gebild. NaHU entspr. 1:2680 NaHU,
„ 2×24 „ „ 37° 0,304 g „ od. 0,343 g gebild. NaHU entspr. 1:2940 NaHU,
„ 7×24 „ „ 37° 0,256 g „ od. 0,314 g gebild. NaHU entspr. 1:3190 NaHU,
„ 14×24 „ „ 37° 0,202 g „ od. 0,229 g gebild. NaHU entspr. 1:4370 NaHU,

} 6 Wochen altes steriles Serum

nach 3 und 4 Wochen gleiches Resultat.

Nach 1 Std. bei 37° 1,72 g Harnsäure od. 1,94 g gebild. NaHU entspr. 1:516 NaHU,
„ 24 „ „ 37° 0,237 g „ od. 0,268 g gebild. NaHU entspr. 1:3730 NaHU,
„ 2×24 „ „ 37° 0,214 g „ od. 0,242 g gebild. NaHU entspr. 1:4130 NaHU

} frisches Serum

nach 3×24 Std. und später gleiches Resultat.

[1]) Da Rinderserum (nach Folin und Denis, Journ. of Biolog. Chem. 14, 29 bis 42) nur 2 mg Harnsäure im Liter enthält, so erübrigt es, hier diesen Betrag zu berücksichtigen.

Nach 1 Std. bei 37° 2,03 g Harnsäure od. 2,29 g gebild. NaHU entspr. 1:437 NaHU
(Mittelwert aus 3 Versuchen),
„ 8×24 „ b. 37° 0,151 g Harnsäure od. 0,171 g gebild. NaHU entspr. 1:5848 NaHU
} frisches Serum

Mittelwert aus den 5 Versuchen:

Anfangslöslichkeit 1,81 g Harnsäure od. 2,05 g gebild. NaHU entspr. 1:488 NaHU,

Endlöslichkeit 0,189 g „ „ 0,214 g gebild. NaHU entspr. 1:4673 NaHU.

Ersatz von Na durch K in den Serumsalzen.

Bereits in unserer früheren Veröffentlichung hatten wir darauf hingewiesen, daß K in unverhältnismäßigem Grad die Ausscheidung von Uraten aus Serum hindert. Um hierfür weitere Unterlagen zu gewinnen, haben wir folgende Versuche angestellt.

Wir sättigten salzfreie Serumalbuminlösung (mit 7,6% Serumalbumin) mit NaHU und fügten diesem die Adler'schen Serumsalze zu, in denen das NaCl durch äquivalente Mengen KCl ersetzt war. Den mehr oder weniger starken Niederschlag von Uraten bezeichnen wir im folgenden mit

\+ geringer Niederschlag,
++ mittlerer „
+++ starker „

± heißt, nach dem Durchschütteln enthält ein Tropfen der Lösung etwa eine Uratnadel im Gesichtsfeld.

	Uratniederschlag nach			
	24 Std.	2×24 Std.	3×24 Std.	4×24 Std.
NaHU-Serum + Serumsalze	+	+	+	+++
„ + Serumsalze mit $^3/_4$ NaCl und $^1/_4$ KCl	±	±	±	++ bis +++
NaHU-Serum + Serumsalze mit $^1/_2$ NaCl und $^1/_2$ KCl	—	—	—	±
NaHU-Serum + Serumsalze mit $^1/_4$ NaCl und $^3/_4$ KCl	—	—	—	—
NaHU-Serum + Serumsalze mit 0 NaCl und $^1/_1$ KCl	—	—	—	±

Wir sehen somit, daß ein sukzessiver Ersatz des NaCl durch KCl in den Blutsalzen die Ausscheidung von Uraten aufhebt. Analoges konnten wir durch Ersatz der Natriumsalze durch Magnesiumsalze erreichen.

Überblicken wir nun nochmals kurz die Ergebnisse.

Harnsäuren lösen sich in Wasser bei 37° in 1 Liter 64,9 mg oder 1:15505, in salzfreier Serumalbuminlösung mit einem Gehalt von 7,6% Serumalbumin bei 37° in 1 Liter 668 mg bis 549 mg oder 1:1497 bis 1:1820.

Die Löslichkeit ist also durch die Gegenwart des Serumalbumins um etwa das 10fache erhöht.

Wenn wir überlegen, wodurch diese große Löslichkeitsvermehrung bedingt ist, so können wir an eine rein mechanische Adsorption durch das kolloide Albumin denken. Näherliegend ist noch eine Harnsäurealbuminverbindung, denn die Albumine sind ja amphotere Körper. Schließlich ist auch der Gedanke nicht ganz von der Hand zu weisen, daß der Kalkgehalt des Albumins bei der Bindung der Harnsäure eine gewisse Rolle spielt. Während es, wie S. 476 ausgeführt ist, gelingt, sämtliche Alkalisalze aus dem Albumin zu entfernen, war dies beim Kalk nicht möglich; vielleicht wird aus den hydrolytisch gespaltenen Ca-Salzen das $Ca(OH)_2$ vom Albumin adsorbiert oder es ist im Sinne Ronas gebunden. Wir kennen ja auch von P. Großer[1]) die engen Beziehungen des Kalkes zu den Eiweißkörpern.

Mononatriumurat hat die Tendenz, übersättigte wässerige Lösungen zu bilden, in denen ein Teil des NaHU, wie wir durch Ultrafiltration (vgl. S. 479/80) nachgewiesen haben, als Kolloid enthalten ist. Ist die Lösung bei einer Temperatur von 60° oder mehr hergestellt und auf 18° abgekühlt, so erreicht man nach mehreren Wochen ein Lösungsminimum von 1:454 (statt 1:1270), während eine bei 37° hergestellte und auf 18° abgekühlte Lösung nach 5 Wochen annähernd die normale Löslichkeit erreicht. Durch Lösung bei Temperaturen von 60° und mehr hat eine Veränderung stattgefunden, und es haben sich Stoffe gebildet, die die Löslichkeit erhöhen bzw. die Rückkehr aus dem kolloiden in den krystalloiden Zustand behindern.

---

[1]) Diese Zeitschr. 48, 427 bis 431.

Bei wässerigen Lösungen von Mononatriumurat (bei 37° oder weniger angefertigt) wird von beiden Seiten die gleiche Löslichkeit annähernd erreicht, d. h. es ist schließlich kein erheblicher Unterschied in der Löslichkeit, ob man durch Schütteln das NaHU in Lösung bringt, oder ob man aus einer überfüllten Lösung den überschüssigen Teil zur Abscheidung bringt.

Stellt man Lösungen von Mononatriumurat in salzfreiem Serumalbumin her, so ist es auch hier zum Schluß ziemlich gleichgültig, auf welche Weise die Lösung erreicht wird.

Man erhält bei 37° und einem Gehalt von 7,6% salzfreiem Serumalbumin folgende Zahlen:

bei Schütteln 1:2100,
bei Entstehen aus übersättigter Lösung . . 1:1760.

Durch die Gegenwart des Serumalbumins wird die Löslichkeit des Mononatriumurats auf etwa den dritten Teil herabgesetzt (1:2100 bzw. 1:1760 statt 1:665). Es ist auch sehr instruktiv, daß bei gleichen Versuchsbedingungen die Erhöhung des Serumalbumingehalts die Löslichkeit des NaHU vermindert,

bei 4,52% Albuminlöslichkeit des NaHU . 1:1600,
„ 7,6% „ „ „ . 1:2100.

Auch bei salzfreien Serumalbuminlösungen von Mononatriumurat wird bei geeigneter Versuchsanordnung von beiden Seiten annähernd die gleiche Löslichkeit erreicht.

Neben dem Serumalbumin befinden sich im Serum noch Salze und Globulin.

Wir sahen auf S. 482, daß sich bei Gegenwart von Serumsalzen 70 mg NaHU in 1000 ccm lösen (1:14300); ist jedoch gleichzeitig durch diese Salze Globulin in Lösung gebracht, so gehen nur noch 20 bis 25 mg NaHU pro Liter in Lösung (1:40000 bis 1:50000).

Nachdem wir durch diese Analyse einen Einblick erhalten haben, welche Faktoren im einzelnen die Löslichkeit des NaHU im Serum herabsetzen, wollen wir nochmals auf die Löslichkeit des Mononatriumurats im Gesamtserum eingehen: Die Löslichkeit beträgt 1:3921 bzw. 1:4673. Sie ist also höher wie in

der wässerigen Serumsalzlösung oder in der Serumsalzlösung + Globulin; sie ist jedoch niedriger als in dem salzfreien Serumalbumin. Trotzdem NaHU in Wasser allein leichter löslich ist als bei Gegenwart von Serumalbumin, begünstigt letzteres doch die Löslichkeit gegenüber der Salz-Globulinlösung, die die Löslichkeit des NaHU außerordentlich herabsetzt.

Aus unseren Untersuchungen erhellen zwei Momente, die bei der Frage der Uratlöslichkeit eine große Rolle spielen:

1. Die Zeit: In allen betrachteten Fällen nimmt die Erreichung eines Endstadiums aus der überfüllten Lösung sehr lange Zeit in Anspruch, meist Wochen. Während bei den wässerigen Lösungen das Stadium der kolloiden Lösung nur ein kurzes Übergangsstadium bildet, kann es bei Gegenwart anderer Kolloide (Serumkolloide) eine Beständigkeit von Wochen erlangen. Dies ist nach der biologischen Seite, nämlich für das Gichtproblem, von größter Bedeutung. Bei der Bildung des NaHU aus den Nucleinen vermögen sich stark überfüllte Lösungen zu bilden. Dadurch, daß die Erreichung des Endzustandes, d. h. des Überganges aus der flüssigen Phase in die feste, sehr langsam vor sich geht, ist Gelegenheit geboten, den Überschuß an Uraten wieder aus dem Körper herauszuschaffen, während er bei schneller Erreichung des Endzustandes sich zum Nachteil des Organismus im Innern desselben deponieren müßte.

2. Die Uratmenge und die Schüttelgeschwindigkeit. In unserer früheren Veröffentlichung[1]) hatten wir für die Löslichkeit des NaHU niedrigere Zahlen erhalten. Bei jener Versuchsanordnung war der Überschuß an Urat sowie die Schüttelgeschwindigkeit eine geringere gewesen. Es erhellt daraus, daß die Lösungstension bzw. die Diffusionsgeschwindigkeit des NaHU in Serum eine sehr niedrige ist. Die in unserem vorliegenden Aufsatz angewandte Versuchsanordnung entspricht den Forderungen, die der Physiko-Chemiker stellt; während die Versuchsanordnung unserer ersten Veröffentlichung den Bedingungen entspricht, wie sie im Organismus vorliegen, d. h. es wird unter den Zirkulationsbedingungen, die im Organismus vor sich gehen, nur äußerst schwer sein, ausgeschiedenes NaHU wieder in Lösung zu bringen.

[1]) Diese Zeitschr. 20, S. 189—214.

Die sub 1 und 2 angeschnittenen Fragen lassen sich auch so ausdrücken: Es ist sehr viel leichter, die Bildung der festen Phase von Mononatriumurat aus einer überfüllten Lösung zu verhindern, als Uratdepots wieder in Lösung zu bringen.

3. Mit dem Nachweis der kolloiden Lösung von Mononatriumurat ist der Beweis erbracht, daß Mononatriumurat in einer solchen Form im Blut gelöst sein kann, in der es die Nieren nicht zu passieren vermag.

Über die Verteilung des Glykogens im Blute während der Resorption der Kohlenhydrate im Darmrohr.

Von

Osw. Polimanti.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Perugia.)

(Eingegangen am 22. Mai 1914.)

Im Jahre 1907 erschienen zwei Arbeiten von F. De Filippi[1]), die den Kohlenhydratstoffwechsel betrafen bei Hunden, die unter Ausschaltung der Leber mit Eck-Pawlowscher Fistel zwischen Pfortader und Vena cava operiert worden waren. Die gute Verwertung der zur Ernährung dienenden Zuckerarten und Kohlenhydrate, die sich wenig vom Normalen unterschied, wovon eben in der ersten Abhandlung die Rede ist, veranlaßte den Autor, in einer zweiten Reihe von Untersuchungen zu studieren, ob in Ermangelung der Leber andere Organe und an erster Stelle das Muskelsystem die Fähigkeit besitzen, die Zuckerarten dem Kreislauf zu entziehen, indem sie sie in Form von Glykogen aufspeichern.

Das Resultat der Experimente wies bei Hunden, die auf geeignete Weise ernährt wurden, eine sehr starke Glykogenablagerung in den Muskeln nach, wie sie sich bei überernährten Hunden vorfindet, während die ausgeschaltete Leber sehr wenig

[1]) F. De Filippi, Der Kohlenhydratstoffwechsel bei Hunden, die mit Ecks Fistel nach der Pawlowschen Methode (direkte Einführung des Pfortaderblutes in die Vena cava mit Unterbindung der Pfortader) operiert wurden. I. Mitteilung. Untersuchung über die alimentäre Glucosurie. Zeitschr. f. Biol. 49, 511 bis 517; Der Kohlenhydratstoffwechsel bei den mit der Eckschen Fistel nach Pawlowscher Methode (direkte Einführung des Pfortaderblutes in die Vena cava, mit Verschluß der Pfortader am Leberhilus) operierten Hunden. II. Mitteilung. Untersuchungen über die amylogenetische Tätigkeit der Muskeln. Ebenda 50, 38 bis 74.

davon enthielt, wie in der Leber von Hunden im Inanitionszustand.

Es war kein Unterschied vorhanden zwischen dem Glykogen des Muskelsystems normaler Hunde und dem von Hunden, die mit Eck-Pawlowscher Fistel operiert worden waren (II. Mitteilung, S. 65 und 66).

Allerdings ergab die Untersuchung (II. Mitteilung, S. 61 u. 72) die merkwürdige Tatsache einer zirkulierenden Glykogenmenge des Blutes (in der Verdauungsperiode getöteter Hund) in bisher nicht konstatierten Verhältnissen (III. Hund, Blut der V. jugularis: 357,1 mg Glykogen pro 100 g Blut).

Dieser Umstand veranlaßte den Autor, eine vergleichende Untersuchung des Glykogens[1]) im Blut der V. portae, sowie des peripheren venösen und arteriellen Systems beim normalen Hunde anzustellen, der zur Zeit der Resorption einer an Kohlenhydraten und Traubenzucker reichen Mahlzeit getötet wurde.

Pro 100 g Blut fand er an Glykogen:

V. portae . . . . . 98,04 mg
A. carotis . . . . . 62,90 „
V. cava abdominalis . . . . 38,85 „

d. h. pro 1 g Glykogen in der V. cava 1,61 g in der A. carotis und 2,52 g in der V. portae.

Dies war ohne Zweifel ein sehr interessantes Resultat, weil bis zu jener Zeit im Blute normaler Hunde nur wenige Milligramm Glykogen gefunden worden waren.

Huppert[2]), der zuerst das Glykogen erkannte und aus dem Blute isolierte, fand davon beim Hunde 1,56 mg pro 100 g (Mittel aus drei Analysen).

Schöndorff[3]) fand im Blute von drei normalen Hunden die überernährt waren, 1,5, 4,5 und 6,1 mg pro 100 g Blut.

Diese Angaben De Filippis wären an und für sich sehr beweiskräftig und können zu Schlüssen über die Form führen, in der der Zucker vom Verdauungsrohr absorbiert wird; der Autor spricht jedoch den Zweifel aus, daß sie durch die Moda-

[1]) F. De Filippi, Sulla ripartizione del glicogeno nel sangue durante l'assorbimento di idrati di carbonio nell' intestino. Nota preventiva. Bollettino R. Accademia medica di Roma **33**, 150 und 151, 1907.

[2]) Huppert, Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**, 144, 1894.

[3]) B. Schöndorff, Arch. f. d. ges. Physiol. **99**, 191 bis 221, 1903.

litäten bedingt sind, unter denen die verschiedenen Blutportionen aufgefangen und analysiert wurden.

Da ich wohl weiß, welche Bedeutung einer Prüfung zukommen würde, die, wenn sie ein positives Resultat ergibt, eine auffallende Analogie der Verdauung der Eiweißstoffe, der Fette und der Kohlenhydrate (Synthese der Spaltungsprodukte in der Darmwand) ergeben würde — abgesehen von dem Licht, das das Ergebnis auf das Entstehen des duodenalen Diabetes, des Diabetes infolge Läsion des Plexus solaris, der alimentären Glucosurien usw. werfen würde — glaubte ich, daß die Durchführung diesbezüglicher Untersuchungen eine große Bedeutung haben könne.

Ich wollte deshalb untersuchen, wie sich die Glykogenmenge im Blute eines Hundes verhält, der während der Resorption einer an stärkehaltigen Stoffen und Zucker reichen Mahlzeit getötet wurde.

7. II. 1914. Jagdhund von 19,350 kg Körpergewicht.

8^h 40′ morgens wird eine Mahlzeit gereicht bestehend aus:

Schwarzbrot (Kommißbrot) . . .	350 g
Traubenzucker (Kahlbaum) . . .	60 g
Kuhmilch	1 l.

10^h. Das Tier wird in Morphiumnarkose versetzt (5 ccm einer 2 %igen Morphiumsulfatlösung); es hat sich zweimal erbrochen. Es wird in den Ausspannapparat gebracht und leicht chloroformiert. Nach Eröffnung des Abdomens sieht man die abdominalen Lymphgefäße vollständig gefüllt, weshalb sie sehr deutlich zutage treten.

Ich entnahm nacheinander die folgenden Blutmengen:

A. 10^h 40′ (2 Stunden nach der Mahlzeit) 123 g Blut aus der A. carotis;

B. 11^h (2 Stunden 20 Min. nach der Mahlzeit) 163 g Blut der V. cava abdominalis;

C. 11^h 10′ ($2^1/_2$ Stunden nach der Mahlzeit) 155 g Blut aus der V. portae.

Die einzelnen Blutportionen werden direkt in Kolben aufgefangen, die 100 ccm 60 %ige KOH enthalten, und hierauf ins kochende Wasserbad gebracht.

Zur quantitativen Bestimmung des Glykogens wird das

abgekürzte Pflügersche Verfahren[1]) (Invertierung, Reduktion und Bestimmung des Zuckers mit dem Polarimeter, die bei Multiplikation mit 0,927 den Wert des Glykogens ergibt) verwendet.

Mit dieser Methode fand ich pro 100 g Blut:

A. Blut der A. carotis . . . . . 58,21 mg Glykogen
B. Blut der V. cava abdominalis . 34,25 „ „
C. Blut der V. portae . . . . . 96,75 „ „

d. h. pro 1 g Glykogen in der V. cava 1,69 g in der A. carotis und 2,82 g in der V. portae.

Die Untersuchungen F. De Filippis werden also vollständig bestätigt durch dieses Experiment, das absolut beweiskräftig ist, weil alle Versuchskautelen (Blutentnahme, Untersuchungsmethode, Reinheit der zur Analyse dienenden Mittel usw.) genau beobachtet wurden. Eine Frage, die wir uns sofort stellen müssen, ist diese: Stammt das Glykogen, das wir in der Leber und in höherem oder geringerem Grade in allen Organen abgelagert finden, alles aus dem Darmrohr präformiert, oder wird es auch in situ in den verschiedenen Organen und Geweben hergestellt? Nach meiner Ansicht schließt die Bildung in der Darmwand die in den Organen und Geweben nicht aus. Und in dieser Hinsicht würde ein vollständiger Parallelismus mit dem Fett vorhanden sein.

Aber dennoch ist die Schutzschranke gegen das Eindringen des Zuckers nicht die Leber, sondern in erster Linie die Darmwand (wie auch gegen die Spaltungsprodukte der Eiweißstoffe). In unserem Falle, bei an Kohlenhydraten, Traubenzucker und Milch sehr reicher Ernährung, stammte das Glykogen aus dem Monosaccharid Traubenzucker, aus dem Milchzucker (dieses Disaccharid spaltet sich vermittels des Lactaseferments in die beiden Bestandteile Traubenzucker und Galaktose) und aus der Stärke, die sich in Zucker umwandelt. Einige Autoren sind der Ansicht, daß Glykogen auch aus dem Eiweiß und endlich, wie man an annimmt, auch aus dem Fett herstammen kann.

Nun wissen wir aber, daß der Weg des Eindringens der Kohlenhydrate die Blutbahn ist und erklären uns dadurch den Glykogenreichtum des Blutes der verschiedenen Gefäßgebiete.

[1]) E. Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol. **103**, 169.

Das Glykogen wird also hauptsächlich in der Darmwand gebildet und von hier aus durch die Blutbahnen absorbiert.

Mit dieser unserer Anschauungsweise, daß nämlich das Glykogen vorzugsweise von seiten der Darmwand gebildet wird, erklären wir uns leicht alle jene Diabetesfälle, auf die ich oben hinwies [duodenaler Diabetes (infolge Abtragung des Duodenums), infolge Abtragung des Ganglion coeliacum usw.]. In diesen Fällen beseitigen wir ja einen Teil des Darmrohres (das Duodenum), oder wir stören die normale Funktionsfähigkeit des letzteren, indem wir einen Teil des sympathischen Nervensystems, das seine Innervation versorgt (Ganglion coeliacum), lädieren oder abtragen.

Also verhindern wir in dem einen wie in dem anderen Falle im Darmrohr die normale Bildung des Glykogens aus den verschiedenen Zuckerarten, die, weil sie die Darmrohrschranke, die ihre Umbildung in Glykogen verursacht, nicht mehr normal finden, sich nun als solche in den Blutkreislauf ergießen, von wo aus sie alsdann durch das Nierenfilter im Harn erscheinen.

Über eine Modifikation des Ultrafiltrationsapparates.

Von

P. Kirschbaum.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig-Spiegler-Stiftung, Wien.)

(Eingegangen am 18. Mai 1914.)

Mit 3 Figuren im Text.

In einer Abhandlung von Ernst Přibram, diese Zeitschr. **44**, 293, über Diastase wurde ein in unserem Laboratorium nach vielen Vorversuchen schließlich von Aladar Elfer konstruierter Kolloidfiltrationsapparat beschrieben, dessen Konstruktion sich durch relative Billigkeit, leichte Reinigung und tadelloses Funktionieren auszeichnet, da ein seitliches Ausweichen der Flüssigkeit und Abtropfen, ohne das Kolloidfilter zu passieren, verhindert wird. — Der Apparat läßt sich in wenigen Minuten in Funktion setzen. —

Gelegentlich meiner Untersuchungen über das Dysenterietoxin (Wiener klin. Wochenschr. 1914, Nr. 12) habe ich diesen Ultrafiltrationsapparat viel benützt und dabei einige Mängel konstatieren können, die durch eine im folgenden zu beschreibende Modifikation behoben werden. Bei längerem Gebrauche kann die Versilberung des Innern schadhaft werden, so daß teilweise die Kupferbronze bloßliegt und die zu filtrierende Flüssigkeit Gelegenheit findet, das Kupfer anzugreifen und in sich aufzulösen. Bei quantitativen Versuchen ergibt sich bei der alten Konstruktion die Schwierigkeit, daß zwischen den Dichtungsringen eventuell Flüssigkeit und Niederschlag zurückgehalten werden und der Niederschlag von der Gummidichtung sich nur schwer quantitativ und rein entfernen läßt. Aus diesen Gründen habe ich folgende Modifikation konstruiert, welche die vorstehend beschriebenen Mängel vermeidet.

Der neue Ultrafiltrationsapparat[1]) besteht, ähnlich wie der Apparat von A. Elfer, aus einem glockenförmigen Oberteil (*d*) und einem auf einem Dreifuß ruhenden, in der Mitte siebartig durchlöcherten (vgl. Fig. 2 *K*) Unterteil. In der Kuppel des Oberteiles ist ein abschraubbarer Rohrstutzen eingebaut, in den das Gaszuleitungsrohr (*b*) einmündet. Etwas tiefer ist das Gasauslaßrohr (*c*), mit einem Schraubenventil versehen, angebracht. An der Stelle, wo das Gaszuleitungsrohr rechtwinklig in das Stutzeninnere hineinragt, befindet sich, ebenfalls abnehmbar, eine Rührschlange nach Burian (*f*), deren unterer Abschnitt aus chemisch reinem (sog. Fein-) Silber verfertigt ist. Am oberen Stutzenende befindet sich ein Metallmanometer, das den im Innern des Apparates herrschenden Druck anzeigt.

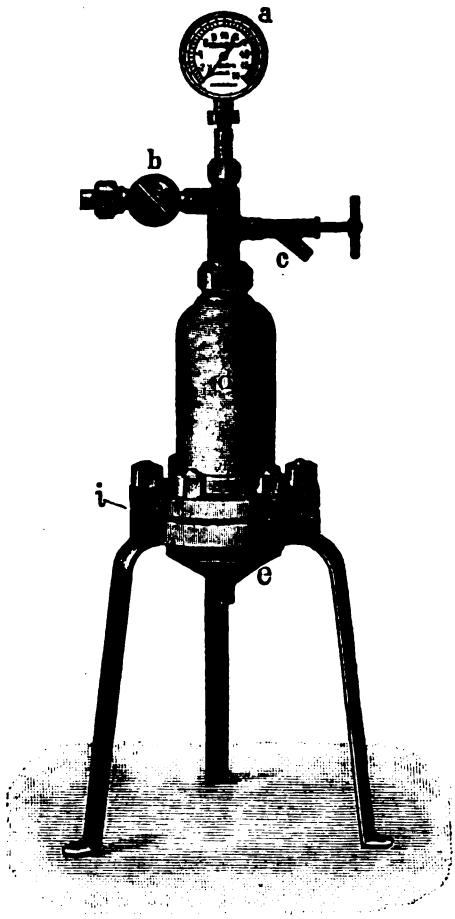


Fig. 1.

Der Unterteil besitzt einen treppenförmig erhabenen Rand, mit dem ein entsprechender Ausschnitt des Oberteiles korrespondiert. Zweck dieser Vorrichtung ist, das lästige Hineingelangen des Dichtungsringes (*i*) in den Bereich der den Apparat abschließenden Schraubengewinde zu verhindern.

[1]) Zu beziehen von der Firma Stefan Baumann, Wien VIII, Florianigasse.

Die durchlöcherte Mittelpartie des Unterteiles trägt eine Siebplatte aus Feinsilber (*h*), auf die das Ultrafilter gelegt wird. Darüber befindet sich ein Hohlzylinder aus Feinsilber (*g*), unten in einem breiten, horizontal umgekrempten Rand auslaufend. Zwischen diesem horizontalen Teile des Silberzylinders und dem Oberteile befindet sich ein Dichtungsring aus Kautschuk. Die abfiltrierte Flüssigkeit fließt durch einen Silbertrichter (*e*) ab.

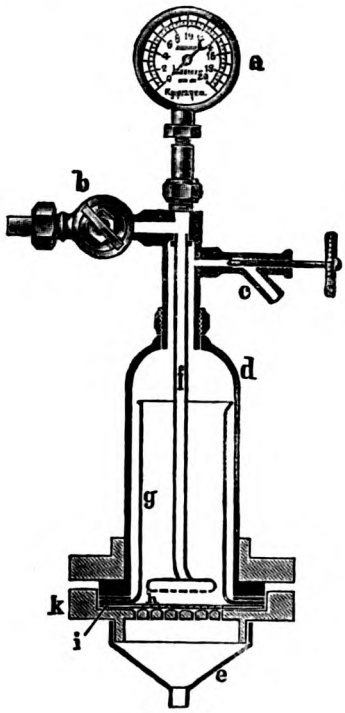


Fig. 2.

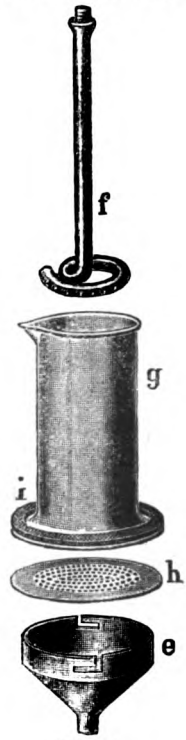


Fig. 3.

Durch Einschaltung eines Hohlzylinders in den Innenraum des Ultrafiltrationsapparates ist ein prinzipiell neuer Teil hinzugekommen, der m. E. einige nicht zu unterschätzende Vorteile bietet. Da sich infolge des durch den festen Verschluß bedingten Druckes das Ultrafilter sowohl an die Siebplatte als auch an den horizontalen Rand des Hohlzylinders anpreßt, so entsteht aus dem Hohlzylinder und der Siebplatte ein regelrechtes „Becherglas", das sich durch Anbringung entsprechender Klammern an den Rändern noch weiter fixieren läßt. Der

Vorteil eines solchen „Becherglases“ liegt auf der Hand. Vor allem die Leichtigkeit, mit der nunmehr quantitative Versuche ausgeführt werden können, da einerseits nicht erst der ganze, schwere Apparat umgekippt zu werden braucht, um z. B. einen flüssigen Filterrückstand zu entleeren. Andererseits wird das Anhaften von Filterrückstand am Gummiring vermieden. Der Gummiring kommt mit dem Versuchsmaterial, wie aus den Abbildungen ersichtlich, überhaupt nicht in Berührung.

Die Rührschlange ist nicht wie bei der früheren Konstruktion an der Seitenwand des Apparates angebracht, sondern im Rohrstutzen. Diese Änderung bietet den Vorteil, daß man den Rührer viel leichter und nötigenfalls auch während eines Versuches abschrauben bzw. ausschalten kann, ohne daß man im letztgenannten Falle gezwungen wäre den Apparat auseinanderzunehmen.

Schließlich — last not least — besitzt der neue Apparat um eine Öffnung, und zwar, was doppelt in die Wage fällt, eine Seitenöffnung weniger. Wer mit Ultrafiltrationsapparaten längere Zeit unter Anwendung hohen Druckes zu arbeiten Gelegenheit hatte, der weiß, wie schwer es ist, einen Apparat auf die Dauer dicht zu erhalten, und wird diesen Vorteil nach Gebühr einschätzen.

Die Notwendigkeit, mehrere Teilstücke des Apparates aus reinem Silber herzustellen, ergab sich aus dem eingangs erwähnten Umstande, daß die Versuchsflüssigkeit (in meinem Falle Bouillonkulturen) alsbald nach Wegwaschung des dünnen Silberbelages der Innenwand des Gefäßes aus demselben das chemisch sehr avide Kupfer auszulaugen begann. Doch können selbstverständlich auch andere Metalle (z. B. Nickel) zur Herstellung dieser Bestandteile verwendet werden, in Fällen, wo es sich a priori um dem betreffenden Metall gegenüber indifferente Stoffe handelt.

Durch die hinzugekommenen Silberteile gestaltet sich selbstverständlich auch der Preis des Apparates entsprechend höher. Wenn man aber bedenkt, daß die immer wieder notwendig gewordenen Neuversilberungen sich mit der Zeit auch als recht kostspielig erweisen, ohne daß man dafür als Äquivalent sichere und einwandfreie Resultate erzielt, so muß man sich doch schließlich sagen, „teuer ist billig“.

Druckfehlerberichtigung

zu

C. G. L. Wolf.

(Diese Zeitschr. Bd. 63, S. 65.)

Zeile 6 und 7 von unten. Lies:

N im Haar statt N im Harn bei Rinderherzdiät
und N im Haar statt N im Harn bei Hundefleischdiät.

Autorenverzeichnis.

Bechhold, H., und J. Ziegler. Vorstudien über Gicht. III. S. 471.

Bien, Z., siehe Rona und Bien.

Böe, Gunnar. Untersuchungen über die Bedeutung der Schilddrüse für den Kohlenhydratstoffwechsel. S. 450.

Doby, G. Über Pflanzenenzyme. I. S. 111.

Elfer, Aladár, und Béla v. Purjesz. Beiträge zur Ausscheidung des Kaliums bei einer Malariaerkrankung. S. 63.

Erlenmeyer, Emil. Darstellung von Links- und Rechtszimtsäure durch asymmetrische Induktion. S. 296.

— Über die asymmetrische Synthese von l- und d-Isovaleriansäure mit Hilfe der asymmetrischen Induktion. S. 366.

— Darstellung von linksdrehendem Benzaldehyd durch asymmetrische Induktion mit Hilfe von Rechtsweinsäure, Überführung desselben in linksdrehendes Mandelsäurenitril und rechtsdrehende Mandelsäure, ein Beitrag zur Erkenntnis enzymatischer Reaktionen. S. 382.

Fürth, Otto von. Über die Beziehungen der Milchsäure zum Kohlenhydratstoffwechsel. I. S. 131. II. S. 156.

— und Theodor Hryntschak. Über den Karnosingehalt der Säugetiermuskeln. S. 172.

Gayda, Tullio. Die Aminosäuren des durch Schwefelsäure hydrolysierten Pferdefleisches. S. 438.

Hekma, E. Über das Fibrin und und seine Beziehung zu einigen Problemen der Biologie und Kolloidchemie. IV. S. 86.

Herzfeld, E. Beiträge zur Chemie der proteolytischen Fermente. S. 103.

Heubner, Wolfgang. Über den Rechnungsfaktor bei der Phosphorbestimmung nach Neumann. S. 393.

— Über Bestimmung anorganischer Phosphorsäure bei Gegenwart von Phosphorsäureestern. S. 401.

— Einige Beobachtungen über Phytin. S. 409.

— und Hermann Stadler. Über eine Titrationsmethode zur Bestimmung des Phytins. S. 422.

Hryntschak, Theodor, siehe Fürth und Hryntschak.

Kerb, J., siehe Neuberg und Kerb.

Kirschbaum, P. Über eine Modifikation des Ultrafiltrationsapparates. S. 495.

Kossowicz, Alexander. Zur Frage der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Hefen und Schimmelpilze. S. 82.

Kostytschew, S. Zur Frage der Bildung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung. S. 237.

Krauß, Friedericke. Weitere Versuche über die Reaktion zwischen Antikörper und gelöstem Antigen. S. 125.

— Über die Bindungsverhältnisse zwischen Antikörper und Antigen. S. 222.

Masslow, M. Zur Frage nach den Zerrüttungen des Knochensystems durch phosphorarme Ernährung. III. S. 106.

Neuberg, C., und J. Kerb. Über die Rolle des Acetaldehyds bei der Alkoholgärung. Bemerkung zur vorstehenden Mitteilung von S. Kostytschew. S. 251.

Pincussohn, Ludwig, und Kurt Rüdiger von Roques. Untersuchungen über die fermentativen Eigenschaften des Blutes. IV. S. 1.
Polimanti, Osw. Über die Verteilung des Glykogens im Blute während der Resorption der Kohlenhydrate im Darmrohr. S. 490.
Purjesz, Béla v., siehe Elfer und Purjesz.
Ranc, Albert. Untersuchungen über die Wirkung von ultravioletten Strahlen auf die Lävulose. S. 257.
Röhmann, F. Über die Ernährung von Mäusen mit einer aus einfachen Nahrungsstoffen zusammengesetzten Nahrung. S. 30.
Rona, P. und Z. Bien. Zur Kenntnis der Esterase des Blutes. VI. S. 13.
— und Koloman von Tóth. Über die Adsorption des Traubenzuckers. II. S. 288.
Roques, Kurt Rüdiger von, siehe Pincussohn und Roques.
Sassa, Rempei. Über die quantitative Bestimmung der Oxyproteinsäurefraktion im normalen und pathologischen Harne. S. 195.
Stadler, Hermann, siehe Heubner und Stadler.
Thorsch, Margarete. Versuche über die Veränderungen von Blutkörperchen durch Osmium und Alkohol. S. 230.
Tóth, Koloman von, siehe Rona und Tóth.
Wagner, Richard. Über Nebennierenkephalin und andere Lipoide der Nebennierenrinde. S. 72.
Wolf, C. G. L. Druckfehlerberichtigung. S. 499.
Ziegler, J., siehe Bechhold und Ziegler.

CHEMISTRY LIBRARY

3 2000 013 063 484

JOURNAL
Does Not Circulate

CHEMISTRY LIBRARY

ALF Collections Vault
3 0000 091 338 842